

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Daniela Alexová

Experimentální modely ischemického poškození mozku

Experimental models of ischemic brain injury

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Karel Valeš, Ph.D.

Praha 2016

Poděkování:

Především bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Karlu Valešovi, Ph.D. a svojí konzultantce Mgr. Lence Kletečkové za ochotu, přístup a množství cenných rad a připomínek, kterými mě po dobu psaní bakalářské práce zásobili. Velice si vážím času a úsilí, jež pročítání práce věnovali. Velké díky patří taktéž mé rodině a přátelům, kteří mi při psaní práce byli značnou oporou.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. 5. 2016

Daniela Alexová

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá tématem experimentálních modelů ischemického poškození mozku, které souvisí s jednou z nejčastějších forem poškození mozku člověka, a to ischemickým insultem. Tento druh poranění mozku je úzce spojen s pozdějšími vážnými neurologickými deficity. Z tohoto důvodu je pro základní i aplikovaný výzkum zcela esenciální studium experimentálních modelů ischemického poškození mozku. První dvě části bakalářské práce jsou věnovány stručnému popisu cévní mozkové příhody u člověka z hlediska druhů, četnosti výskytu, rizikových faktorů a molekulárních mechanismů poranění mozku. Další část práce pojednává o výzvách spojených s experimentálním modelováním ischemického poškození mozku a uvádí specifika velkých a malých laboratorních zvířat. Těžištěm práce je popis vybraných 11 nejpoužívanějších modelů. Vybrané modely byly rozděleny na fokální a globální a v každé této skupině byly dále charakterizovány z hlediska procedurálního provedení, mortality zvířat či úspěšnosti tvorby lézí. V práci jsou taktéž popsány klíčové modifikace modelů zaváděné v průběhu let z důvodu zvýšení reprodukovatelnosti vznikajícího zranění. V závěru práce je shrnuto všech 11 vybraných experimentálních modelů do přehledné tabulky z hlediska jejich důležitých předností a nejčastější výzkumné oblasti jejich aplikace.

Klíčová slova: ischemický insult, animální modely, neurobiologie ischemického poškození, fokální ischemie, globální ischemie

ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on the experimental models of ischemic brain injury closely related to one of the most common forms of brain damage, the ischemic stroke. This type of brain injury is connected to subsequent serious neurological deficits. The studies of experimental models of ischemic brain injury are therefore essential for primary and secondary research. The first two parts of the thesis are dedicated to brief characterization of stroke with focus on types of stroke, incidence, risk factors and molecular mechanism of injury. Next part summarizes the challenges of experimental modeling of ischemic brain injury and the specifics of small and big laboratory animals. The core of the thesis is the description of 11 most frequently used models. Selected models were divided into focal and global models and in each of these categories were furthermore characterized according to procedural performance, animal mortality or success of lesion induction. The key modifications of models introduced during the years in order to increase the reproducibility of brain injury are described as well. All 11 selected experimental models are summarized at the end of the thesis into a well-arranged table according to their important advantages and most common application area.

Key words: ischemic stroke, experimental models, neurobiology of ischemic damage, focal ischemia, global ischemia

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2-VO	okluze dvou cév
3-VO	okluze tří cév
4-VO	okluze čtyř cév
AMPA receptor	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionátový receptor
ASICs	kysele ovládané iontové kanály
ATP	adenosintrifosfát
Ca^{2+}	vápenaté ionty
CINC-1	chemoatraktant neutrofilů indukovaný cytokiny
Cl^-	chloridové ionty
CMP	cévní mozková příhoda
CNS	centrální nervová soustava
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ET-1	endotelin 1
GFAP	gliální fibrilární acidický protein
HB	hematoencefalická bariéra
HI	hemoragický insult
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
K^+	draselné ionty
Na^+	sodné ionty
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NMDA receptor	N-methyl-D-aspartátový receptor
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
P7	sedmý den poporodní
P12	dvanáctý den poporodní
ROS	reaktivní formy kyslíku
RNS	reaktivní formy dusíku
TGF- β	transformující růstový faktor β
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α
VF	ventrikulární fibrilace

OBSAH

ÚVOD	1
1 CÉVNÍ MOZKOVÁ PŘÍHODA.....	3
1.1 DRUHY CÉVNÍCH MOZKOVÝCH PŘÍHOD A JEJICH INCIDENCE V POPULACI.....	3
1.2 RIZIKOVÉ FAKTORY PRO ROZVOJ CÉVNÍCH MOZKOVÝCH PŘÍHOD	4
1.3 ISCHEMICKÉ JÁDRO A ISCHEMICKÁ PENUMBRA	4
1.4 FOKÁLNÍ A GLOBÁLNÍ ISCHEMIE	5
1.5 PORANĚNÍ ZPŮSOBENÉ REPERFUZÍ	6
2 MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY ISCHEMICKÉHO POŠKOZENÍ MOZKU.....	6
2.1 EXCITOTOXICITA	7
2.2 SIGNALIZACE ZPROSTŘEDKOVANÁ VÁPENATÝMI IONTY	7
2.3 LAKTÁTOVÁ ACIDÓZA	8
2.4 VLIV REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU A OXIDU DUSNATÉHO	8
2.5 ZÁNĚTLIVÉ ZMĚNY	9
2.6 REAKTIVNÍ ASTROCYTÓZA A FORMOVÁNÍ GLIOVÉ JIZVY	10
3 SELEKCE ANIMÁLNÍCH MODELŮ	12
3.1 VELKÉ ANIMÁLNÍ MODELY	12
3.2 MALÉ ANIMÁLNÍ MODELY	12
3.3 VÝZVY SPOJENÉ S PŘEVODEM POZNATKŮ DO PRAXE	13
4 MODELY ISCHEMICKÉHO POŠKOZENÍ MOZKU	14
4.1 MODELY GLOBÁLNÍ ISCHEMIE	14
4.1.1 Ischemie vyvolaná strangulací	14
4.1.2 Modely využívající ventrikulární fibrilaci	14
4.1.3 Model okluze čtyř cév	14
4.1.4 Model okluze tří cév	15
4.1.5 Model okluze dvou cév	15
4.2 MODELY FOKÁLNÍ ISCHEMIE	16
4.2.1 Okluze <i>arteria carotis communis</i>	16
4.2.2 Hypoxicko-ischemická encefalopatie	16
4.2.3 Mechanické okluze <i>arteria cerebri media</i>	17
4.2.4 Embolické okluze <i>arteria cerebri media</i>	18
4.2.5 Fototrombotická okluze	19
4.2.6 Aplikace endotelinu 1	20
5 ZÁVĚR	23
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	25

ÚVOD

Mezi nejčastější a nejzávažnější civilizační choroby patří cévní mozková příhoda. Každým rokem toto onemocnění postihuje miliony lidí, z nichž část na jeho následky umírá a část zůstává po zbytek svého života fyzicky a duševně disabilní. Ischemická cévní mozková příhoda neboli ischemický insult, je proto předmětem intenzivního výzkumu, jehož cílem je především odhalit rizikové faktory a podrobně porozumět patofyziologii tohoto onemocnění. Pochopení mechanismů průběhu tohoto onemocnění mozku je zcela klíčové pro určení možných cílů klinických intervencí.

Jedním z kroků k pochopení komplexních mechanismů je popis vzniku ischemické cévní mozkové příhody. K ischemické cévní mozkové příhodě dochází nejčastěji při ucpání některé velké mozkové tepny. Okluze tepny vede ke snížení množství energetických substrátů dodaných do mozku. Následné selhání energetického metabolismu nervových buněk spouští ischemickou a zánětlivou kaskádu, jejímž konečným důsledkem může být smrt zasažených buněk.

Dalším krokem k pochopení průběhu ischemické cévní mozkové příhody je určení rizikových faktorů rozvoje tohoto onemocnění. Hlavním rizikovým faktorem je vysoký věk spojený se zvýšeným výskytem chorob, jako je ateroskleróza, poruchy srážlivosti krve či diabetes mellitus. Z dalších rizikových faktorů je v současnosti diskutována hypertenze, kouření, abdominální obezita a nesprávná životospráva. Přesné určení rizikových faktorů je ale stále předmětem populačních studií.

Z etických důvodů není možné studovat ischemickou cévní mozkovou příhodu na lidských pacientech. Od konce 60. let minulého století jsou proto cíleně vyvíjeny experimentální modely ischemického poškození mozku. Jejich primárním cílem je snížit zásobení mozku glukózou a kyslíkem a napodobit tak podmínky ischemické cévní mozkové příhody, například za účelem vývoje neuroprotektiv. Ischemické poškození je u laboratorních zvířat vyvoláváno řadou metod, jmenovitě například mechanickou okluzí některé z hlavních mozkových tepen či lokálním podáním vazokonstriktoru. Nejpoužívanějším zvířetem je potkan, dostupná je ale i řada dalších živočišných druhů, například myši, kočky, psi či králíci. Každý živočišný druh má ovšem vlastní specifika a je tedy vhodný k jinému druhu experimentů.

Použití experimentálních modelů je klíčové pro výzkum ischemické cévní příhody, je však spojeno s několika výzvami. Především klinická relevance modelů v současnosti není dostatečná, a proto jen velmi málo léčiv prokazatelně účinných v preklinických studiích bylo účinných při klinických testováních. Vědečtí pracovníci se tak snaží o neustálé zdokonalování modelů, aby experimentální modelování ischemického poškození mozku dosahovalo vyšší úrovně a více se přiblížilo k reálné klinické situaci.

Cíle bakalářské práce společně s jejich zařazením do příslušných kapitol jsou:

- Na základě literární rešerše zahraniční odborné literatury stručně charakterizovat ischemickou cévní mozkovou příhodu – Kapitola 1 Cévní mozková příhoda.
- Na základě literární rešerše zahraniční odborné literatury stručně charakterizovat molekulární mechanismy ischemického poškození mozku – Kapitola 2 Molekulární mechanismy ischemického poškození mozku.
- Vzhledem k rozdílným specifickým živočišným druhům porovnat specifika výběru zvířete pro následné experimentální modelování – Kapitola 3 Selektce animálních modelů.
- Vybrat v současnosti nejpoužívanější experimentální modely a porovnat je dle vybraných kritérií – Kapitola 4 Experimentální modely ischemického poškození mozku.

1 CÉVNÍ MOZKOVÁ PŘÍHODA

1.1 Druhy cévních mozkových příhod a jejich incidence v populaci

Cévní mozkové příhody (zkráceně CMP) jsou společně s chorobami srdečními nejčastější příčinou úmrtí a disability lidí ve věku mezi 45 a 69 lety na světě a představují tak obrovské socioekonomické břímě (Strong, Mathers, & Bonita, 2007). Ročně podlehnou následkům cévních mozkových příhod přibližně 5,7 milionů lidí (Strong et al., 2007). Existují domněnky, že pokud nedojde v nejbližších letech k výrazným celopopulačním intervencím v oblasti léčby ischemie, bude do roku 2030 počet obětí CMP čítat 7,7 – 8,4 milionů ročně (Mathers & Loncar, 2006).

Prvním podtypem cévních mozkových příhod je hemoragický insult (zkráceně HI). Jeho hlavní charakteristikou jsou rychle se rozvíjející klinické symptomy neurologické dysfunkce přisouditelné lokálnímu městnání krve uvnitř mozkového parenchymu a subdurálního či subarachnoidálního prostoru (Sacco et al., 2013). Poranění tkáně je primárně zapříčiněno expanzí hematomu, která vyvolává nárůst nitrolebního tlaku. V současnosti dostupné poznatky z preklinických a klinických studií poukazují na možnost, že by druhotné poškození mozkové tkáně po HI mohlo být vyvoláno zánětem (Del Bigio, Yan, Buist, & Peeling, 1996). Oproti ischemickému iktu vykazuje HI vyšší riziko úmrtnosti. (Andersen, Olsen, Dehlendorff, & Kammergaard, 2009). Příčinou HI může být mimo jiné ruptura cévy, aneurysma či fistuly. Další možností vzniku HI je i hemoragická transformace insultu ischemického při trombolytické terapii (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995).

Ischemická CMP je definována jako epizoda neurologické dysfunkce způsobená fokálním mozkovým, páteřním či retinálním infarktem (Sacco et al., 2013). Oproti hemoragickému insultu je častější, statisticky tvoří až 87 % všech případů CMP (Lloyd-Jones et al., 2009). Příčinou rozvoje ischemického insultu může být trombotická nebo embolická okluze některé z hlavních mozkových tepen. Tato CMP může být taktéž vyvolána systémovou hypoperfuzí způsobenou snížením či selháním srdeční aktivity nebo zástavou dechu (Adams et al., 1993).

Četnost výskytu CMP je u jednotlivých věkových skupin rozdílná. Za nejrizikovější jsou považována období perinatální¹ a stařecké. Zvýšený výskyt CMP ve stařeckém období souvisí se zhoršenou zdravotní kondicí člověka a současným výskytem chorob, jako je ateroskleróza, diabetes mellitus, hypertenze atd. Perinatální insult je dle studií oproti CMP vyskytujícím se později v dětství mnohem častější a to s četností přibližně 1:5000 (Lee et al., 2005). Hlavním faktorem znesnadňujícím jeho diagnózu je, že se tento insult nemanifestuje žádnými specifickými symptomy. K jeho odhalení dochází nejčastěji pomocí zobrazovacích metod na základě

¹ Perinatálním obdobím rozumíme periodu života počínající 28. gestačním týdnem a končící 7. dnem poporodním.

nespecifických symptomů². Některé děti ovšem tyto nespecifické symptomy nevykazují, a proto u nich vyšetření nejsou provedena. K odhalení insultu pak může dojít až v pozdějších obdobích, kdy se objeví záchvatovitá aktivita či asymetrie v používání horních končetin (Golomb et al., 2001).

1.2 Rizikové faktory pro rozvoj cévních mozkových příhod

Rizikové faktory pro rozvoj CMP jsou odborníky v současnosti neustále diskutovány. V dosud největší mezinárodní studii INTERSTROKE, jež se účastnilo 3000 lidí z 22 zemí o různém stupni vyspělosti, se na 80 % globálního rizika CMP podílelo pět faktorů – hypertenze, kouření, abdominální obezita, nevhodná dieta a nízký stupeň fyzické aktivity. Z těchto faktorů se zdá být hypertenze nejrizikovějším faktorem pro rozvoj obou podtypů CMP. Zároveň ze studie vyplývá, že by hypertenze mohla být pádnější pro rozvoj hemoragického insultu než pro rozvoj ischemického (O'Donnell et al., 2010). Jiná studie se značným počtem sledovaných osob (39 484) poukazuje na korelace mezi výskytem diabetu, fibrilacemi srdečních síní či ischemickou chorobou srdeční a výskytem ischemického insultu (Andersen et al., 2009). Je ovšem nutno zmínit, že mimo uvedené studie existují i další, jejichž závěry se s uvedenými částečně překrývají, ale také se od nich odlišují (Ariesen, Claus, Rinkel, & Algra, 2003; Kurth et al., 2003). Z uvedeného plyne, že otázka rizikových faktorů a jejich relativních příspěvků ke vzniku CMP či konkrétních podtypů CMP ještě zdaleka není uzavřena a bude tak doajista cílem budoucích studií.

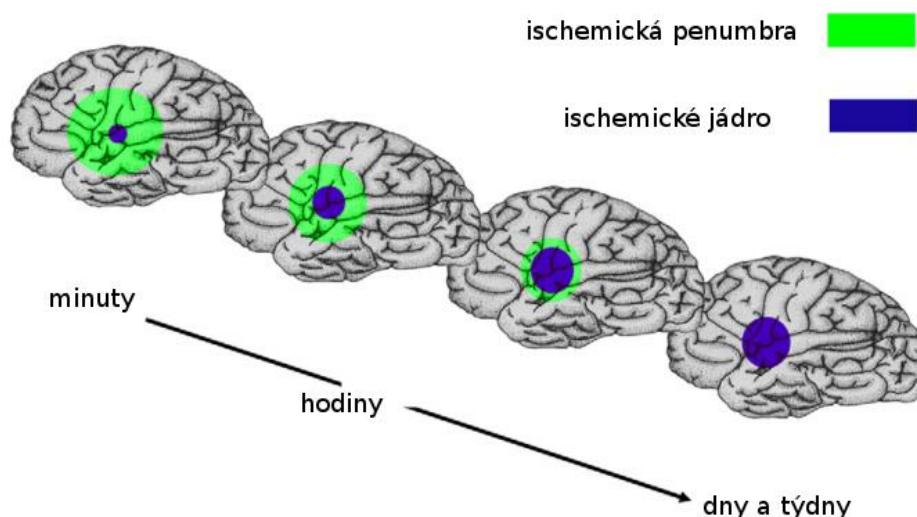
1.3 Ischemické jádro a ischemická penumbra

Ischemie mozku je definována jako snížení krevního toku mozkem pod kritickou hranici, která již vyvolává poškození a omezení funkce celého mozku (globální ischemie) nebo některé z jeho oblastí (fokální ischemie). Ischemická tkáň není homogenní a vyznačuje se existencí ischemického jádra a ischemické penumbry.

Ischemické jádro je oblastí vzniku ischemie. V tomto místě došlo k energetickému a následně i metabolickému selhání buněk. Nedojde-li do několika minut k reperfuzi či terapeutickému zásahu, zasažená tkáň postupně odumírá (Astrup, Siesjö, & Symon, 1981). Ischemická penumbra označuje oblast méně zasaženou ischemií. Funkce buněk je omezena, jejich metabolická aktivita je ale do určité míry zachována. Existuje vyšší pravděpodobnost uzdravení a obnovení činnosti v této oblasti (Astrup et al., 1981). Zda dojde k přežití a obnovení buněčné aktivity zasažených neuronů závisí jednak na jejich selektivní citlivosti k ischemii a na kombinovaném vlivu reziduálního toku a délky trvání ischemie (Heiss & Rosner, 1983). Obě uvedené struktury vykazují časoprostorovou dynamiku, jež nejčastěji vede k rozšíření nekrotického ložiska ischemického jádra na úkor ischemické penumbry (**Obrázek 1**).

² Mezi tyto nespecifické symptomy patří například záchvatovitá aktivita, apnoe či hypotonie.

V ischemickém jádře dochází pouze k jednorázové depolarizaci neuronů, jelikož nejsou neurony důsledkem selhání energetického metabolismu schopny repolarizace. V penumbře je díky částečnému kolaterálnímu zásobení živinami repolarizace možná a dochází tak k periodickému střídání depolarizací a repolarizací, které se po vlnách šíří ischemickou penumbrou. Tyto periinfarktové depolarizace mohou způsobovat další poškození ischemické penumbry (Chen, Chopp, Bodzin, & Chen, 1993). Existují hypotézy, že by se mohly podílet na poranění při akutních patofyziologických stavech mozku člověka (Fabricius et al., 2006).



Obrázek 1 Schematické znázornění časoprostorové dynamiky ischemického jádra (modře) a penumbry (zeleně). Oblast jádra (léze) se postupně zvětšuje, zatímco plocha penumbry se snižuje. Některé klinické symptomy pacienta ustupují, jelikož zároveň dochází k obnovení činnosti neuronů v části penumbry. Převzato a upraveno dle Dirnagl, Iadecola a Moskowitz (1999).

1.4 Fokální a globální ischemie

Globální ischemie je zapříčiněna celkovým snížením krevního toku mozkem. K tomuto stavu dochází nejčastěji důsledkem srdeční zástavy. Dojde-li pouze ke krátkodobému nebo jen mírnému poklesu perfuze (perfuze mezi 20 ml/100 g/min až 7 ml/100 g/min), může být tento stav provázen pouze ztrátou vědomí s následným obnovením funkce zasažených neuronů. Při těžké globální ischemii (perfuze nižší než 7 ml/100 g/min) či ischemii trvající déle než přibližně pět minut již dochází k nekróze většiny neuronů (Kaufmann et al., 1999).

K fokální ischemii dochází nejčastěji po okluzi mozkové tepny či jejích větví. Okluze vede k omezení perfuze v regionu zásobovaném touto tepnou. Nejvýraznějším snížením krevního toku je postižena oblast tvořící ischemické jádro. Pokud nedojde k okamžité reperfuzi, většina neuronů v tomto místě nekroticky umírá v důsledku metabolického selhání a souvisejících jevů ischemické kaskády. S rostoucí vzdáleností od ischemického jádra je neuronům zajištěn alespoň částečný

přísun krve z nezasažených kolaterálních cév. Tato prstencovitá oblast tvoří ischemickou penumbru (Astrup et al., 1981).

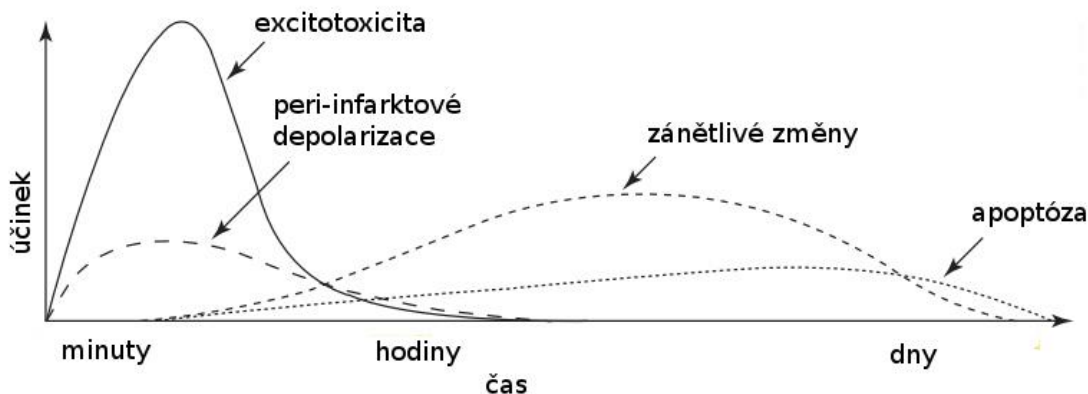
1.5 Poranění způsobené reperfuzí

Po dlouhou dobu panovalo přesvědčení, že rychlá reperfuze ischemické tkáně vede k regeneraci a obnovení funkce orgánu. Tento předpoklad byl zpochybněn v 70. letech minulého století pozorováními, jež odkazovala na paradoxní prohloubení poškození reperfuzované srdeční tkáně (Hearse, Humphrey, & Chain, 1973). Tato pozorování dala základ domněnkám, jež přisuzovaly uvedený negativní efekt činnosti kyslíkových radikálů. O několik let později byly formulovány hypotézy, že nadbytek reaktivních forem kyslíku (angl. reactive oxygen species, zkráceně ROS) zapříčiňuje nerovnováha mezi tvorbou ROS a sníženou antioxidační kapacitou tkáně. Tyto hypotézy byly později podpořeny výsledky experimentálních pozorování (Guarnieri, Flamigni, & Caldarera, 1980).

2 MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY ISCHEMICKÉHO POŠKOZENÍ MOZKU

I když prozatím není dopodrobna porozuměno všem buněčným procesům a drahám, jež jsou při ischemickém insultu aktivovány, panuje přesvědčení, že dochází k postupné aktivaci mechanismů vedoucích k buněčné smrti nervových buněk. Klidový membránový potenciál neuronů je udržován a obnovován především elektrogenní činností Na^+/K^+ ATPázy, která udržuje nízkou koncentraci sodných iontů v intracelulárním prostoru a draselných iontů v prostoru extracelulárním. Udržování membránových potenciálů Na^+/K^+ ATPázou je zodpovědné za spotřebu velké části energie dodané do mozku. Zároveň je také činností Ca^{2+} ATPázy udržována nízká intracelulární koncentrace vápníku.

Při ischemii, během níž je narušena syntéza makroergních fosfátových molekul, dochází k rychlému vyčerpání zásob ATP a depolarizaci membrán neuronů a glií. Tato depolarizace je způsobená především influxem sodných iontů do buňky a efluxem draselných iontů z buňky. Depolarizace membrány neuronů vede k hromadnému výlevu excitačních aminokyselin glutamátu a aspartátu. Nadměrná stimulace excitačními neurotransmitery, označovaná pojmem excitotoxicita, může nervové buňky poškodit či je dokonce usmrtit (Olney, 1969).



Obrázek 2 Časová posloupnost a vliv poškozujících jevů na výsledné poranění při fokální mozkové ischemii. Převzato a upraveno dle Dirnagl, Iadecola a Moskowitz (1999).

2.1 Excitotoxicita

Jelikož je glutamát nejčastějším excitačním neurotransmiterem savčího mozku, hraje při ischemických kaskádách hlavní roli. Při depolarizaci neuronů je glutamát vyloučen do synaptického prostoru po směru svého koncentračního gradientu. Za fyziologických podmínek je ze synaptického prostoru aktivně odčerpáván především astrocyty, které tak brání rozvoji excitotoxicity. Během ischemie jsou odčerpávací mechanismy glutamátu, stejně jako řada dalších protektivních funkcí astrocytů, narušeny (viz podkapitola **Reaktivní astrocytóza a formování gliové jizvy**). Masivní a neregulovaný výlev glutamátu již na počátku ischemie aktivuje velké množství NMDA, AMPA a kainátových receptorů a umožňuje influx Ca^{2+} , Na^+ a Cl^- do buněk. Influx iontů také provází pasivní vtok vody vedoucí k tvorbě edému. Edém může ztížit perfuzi okolní tkáně, zvýšit nitrolební tlak či jinými způsoby negativně ovlivnit další vývoj zranění. Hypotéza glutamátové excitotoxicity byla podpořena experimenty, při nichž byly pozorovány protektivní účinky NMDA antagonistů proti ischemickému poškození (Simon, Swan, Griffiths, & Meldrum, 1984).

2.2 Signalizace zprostředkovaná vápenatými ionty

Vápenaté ionty se účastní buněčných signalizačních drah jako univerzální druzí poslové a modulují činnost buněčných proteáz, lipáz, nukleáz a dalších molekul. Nekontrolovaná činnost těchto enzymů a jejich metabolických produktů (kyselina arachidonová, ROS,...) však poškozuje buněčné membrány, strukturní proteiny a nukleové kyseliny. Poškození mitochondrií těmito enzymy může zapůsobit jako stimul vedoucí k uvolnění cytochromu c a apoptózu-indukujícího faktoru z mitochondriálního intermembránového prostoru a vyústit tak v apoptózu buňky (Susin et al., 1999).

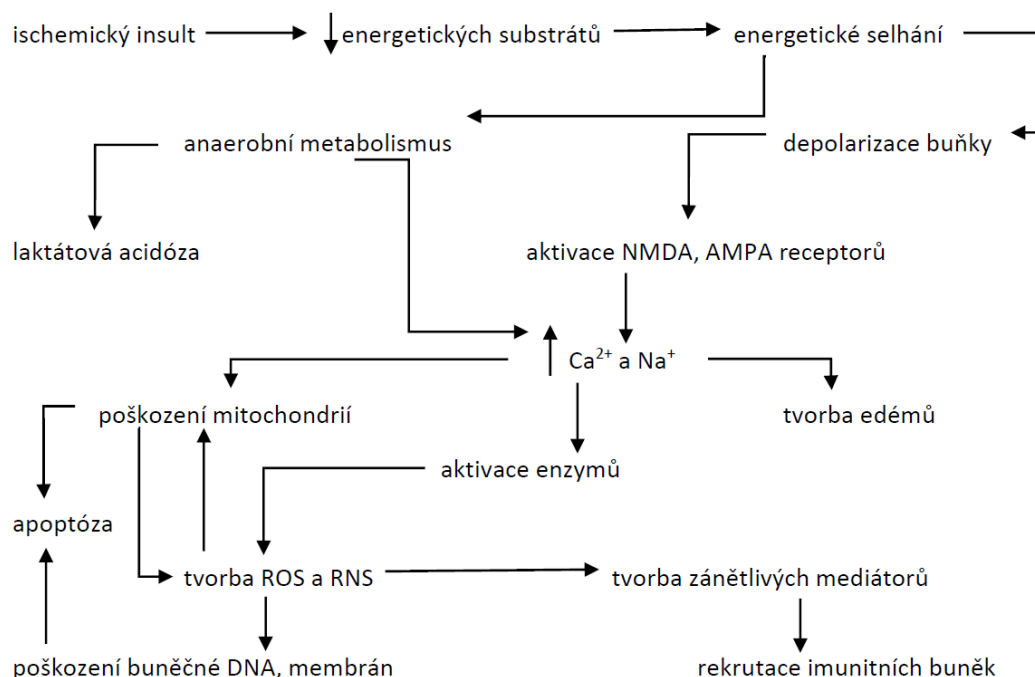
2.3 Laktátová acidóza

Anaerobní metabolismus, jenž nervové buňky během ischemie vykazují, souvisí s tvorbou laktátu a okyslením buněk. Snížení pH vede k aktivaci kysele ovládaných iontových kanálů (angl. acid-sensing ion channels, zkráceně ASICs) propustných pro Na^+ a Ca^{2+} (Krishtal & Pidoplichko, 1980). Laktátová acidóza tak prostřednictvím dalšího zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} prohlubuje poškození buňky. Modulace aktivity ASICs je potenciálním cílem neuroprotektiv při ischemickém insultu (Simon, 2006).

2.4 Vliv reaktivních forem kyslíku a oxidu dusnatého

ROS jsou chemicky reaktivní kyslíkové molekuly schopné oxidativně poškozovat buněčné struktury. Mezi ROS se řadí mnoho molekul, jmenovitě například peroxidy, hydroxylové radikály, superoxidy či singletový kyslík. Produkce ROS je součástí běžné činnosti mozku, při které vznikají jako meziprodukt metabolismu kyslíku (Boveris & Chance, 1973). Bylo zjištěno, že se koncentrace ROS zvyšuje při ischemickém poškození a při reperfuzi (Cao, Carney, Duchon, Floyd, & Chevion, 1988; Guarnieri et al., 1980). Tehdy je značně narušen zejména mitochondriální elektrontransportní řetězec a ROS jsou produkovány ve zvýšené míře. Zároveň jsou antioxidační mechanismy buňky oslabené a redukce ROS není dostatečně efektivní. Mezi významné zdroje ROS v mozku řadíme mimo již zmíněného také xantinoxidázu, monoamin oxidázu a NADPH oxidázu (Kleinschnitz et al., 2010; Patt et al., 1988). Přehledně a detailně jsou současné poznatky o ROS a jejich produkci zpracovány v rešerši od Granger a Kvietys (2015).

NO je plyn syntetizovaný z L-argininu enzymem NO-syntázou (zkráceně NOS) v neuronech, buňkách cévního endotelu, glíích, makrofázích a bílých krvinkách. V závislosti na stupni ischemického poškození a příslušné izoformě NOS má NO duální efekt na průběh ischemické kaskády. Ihned po vzniku ischemického insultu je míra omezení krevního toku do určité míry snížena vasodilatačním efektem NO, který je produkován především endoteliální NOS (Huang et al., 1996). V pozdějším stádiu ischemie se NO produkováný indukibilní a neuronální NOS podílí na oxidativním a nitrosativním poškození (Iadecola, Zhang, Casey, Nagayama, & Ross, 1997). Kombinací NO a superoxidového radikálu vzniká velmi reaktivní peroxynitrit poškozující buněčné komponenty a podílející se na tvorbě dalších ROS (Gursoy-Ozdemir Y, Bolay H, Saribas O, 2000).



Obrázek 3 Zjednodušené schéma průběhu ischemické kaskády a dějů na tuto kaskádu navazujících.

2.5 Zánětlivé změny

Postischemická zánětlivá odpověď mozku je charakterizována rychlou aktivací rezidentních buněk, kterou následuje infiltrace aktivovanými zánětlivými buňkami (Clark et al., 1993; Schilling et al., 2003). Mezi zánětlivé buňky řadíme mimo jiné neutrofilů, leukocyty a makrofágy.

V akutní fázi ischemického insultu jsou ischemickou tkání rapidně produkovány ROS a cytokiny. Cytokiny jsou rozličnou skupinou malých glykoproteinů, jenž jsou po aktivacím stimulu uvolňovány některými buňkami. Po navázání na cílovou buňku modulují její genovou expresi. Některé cytokiny modulují expresi adhezních molekul klíčových pro rekrutaci a adhezi leukocytů. Mezi cytokiny patří i chemokiny, které jsou výraznými chemoatraktanty. Shrnutí dosud známých funkcí vybraných cytokinů je obsaženo v **Tabulce 1**.

V subakutní fázi ischemického insultu je infiltrujícími leukocyty snížena perfuze mikrovaskulatury a dochází k produkci cytotoxických látek v nervovém parenchymu. Těmito procesy jsou amplifikovány poškozující mechanismy, které mohou vést k narušení hematoencefalické bariéry, tvorbě edémů či buněčné smrti. Přibližně den po iktu dochází k aktivaci astrocytů a reaktivní astrocytóze (viz dále). Většina aktivovaných mikroglíí se během několika dní mění ve fagocyty, jenž se taktéž podílejí na dalším poškození postischemické tkáně (Yrjänheikki et al., 1999; Z. Zhang, Chopp, & Powers, 1997).

Tabulka 1 – Shrnutí dosud známých funkcí vybraných cytokinů

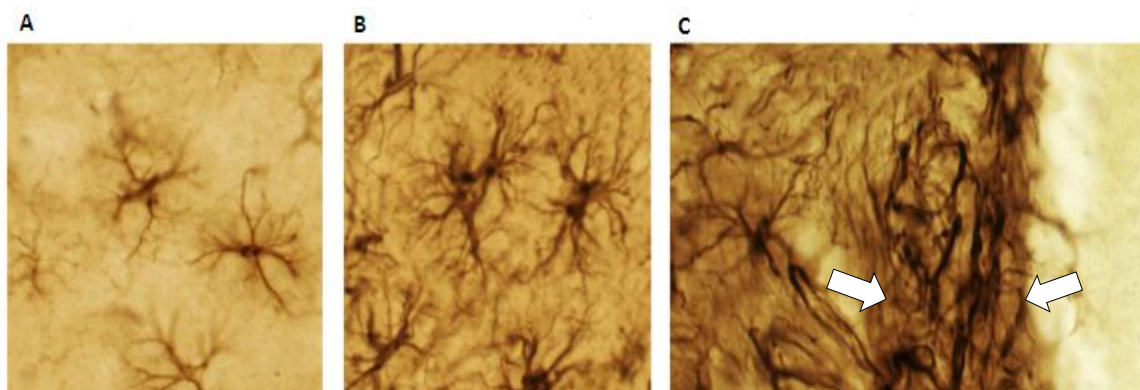
Cytokin	Funkce	Zdroj
IL-1	<ul style="list-style-type: none"> ○ exprese adhezních molekul ○ zvýšení excitotoxicity (NMDA) ○ pyrogenní efekt ○ vazodilatace ○ hypotenze ○ hyperalgesie 	(Dinarello, 2009)
CINC	<ul style="list-style-type: none"> ○ chemoatrakce zánětlivých buněk ○ protein akutní fáze 	(Campbell et al., 2003)
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> ○ syntéza proteinů akutní fáze ○ protizánětlivé účinky ○ stimulace buněčných i látkových obranných mechanismů 	(Heinrich, Castell, & Andus, 1990)
TNFα	<ul style="list-style-type: none"> ○ pyrogenní efekt ○ exprese adhezních molekul ○ aktivace astrocytů a jejich proliferace ○ změny v mikrovaskulatuře ○ role při narušení integrity HB ○ neuroprotektce 	(Sriram & O'Callaghan, 2007), (Barone et al., 1997)
TGFβ	<ul style="list-style-type: none"> ○ neuroprotektce ○ přispívá k uvolnění NO ○ chemoatrakce zánětlivých buněk ○ angiogeneze ○ reparace tkáně 	(Gross, Bednar, Howard, & Sporn, 1993), (Roberts & Sporn, 1988)

2.6 Reaktivní astrocytóza a formování gliové jizvy

Astrocyty svým počtem mnohonásobně převyšují neurony. Stejně jako neurony jsou poškozeny při ischemickém insultu, kdy jsou v důsledku metabolického selhání narušeny jejich funkce spojené s udržováním fyziologické nervové činnosti. Jedná se především o protektivní funkce, jako je eliminace ROS, homeostáza iontů, metabolická podpora a v neposlední řadě již zmíněná schopnost vychytávat glutamát. Během ischemie a pozdější reperfuze mohou astrocyty přispět k regeneraci poškození či naopak ke zhoršení poranění. Zda bude vliv astrocytů pozitivní či negativní se odvíjí od několika faktorů, například na rozsahu a charakteru poškození.

Jedním z charakteristických znaků reaktivní astrocytózy je zvýšená exprese gliálního fibrilárního acidického proteinu (angl. glial fibrillary acidic protein, zkráceně GFAP) a dalších proteinů intermediálních filament, které se podílejí na tvorbě filamentárních sítí. Dalším specifickým astrocytózy je proliferace astrocytů a hypertrofie buněčných výběžků na jejich povrchu. Dle míry uvedených změn jsme schopni rozlišit mírnou, středně těžkou a těžkou astrocytózu. Zatímco při mírné až středně těžké astrocytóze prakticky nesledujeme reorganizaci tkáňové architektury, těžká astrocytóza se již vyznačuje výraznými a ireversibilními změnami ve struktuře tkáně.

Proliferace astrocytů a tvorba překryvů mezi sousedními astrocyty při těžké astrocytóze může být spojena s tvorbou husté a kompaktní gliové jizvy (**Obrázek 4**). Tyto jizvy zastávají funkci neuroprotektivních bariér chránících neporušenou tkáň před zánětlivými buňkami a infekčním agens. Studie poukazují i na inhibiční účinek reaktivních astrocytů a gliové jizvy na regeneraci CNS po zranění (Davies et al., 1997). Shrnutí experimentálních dat o duálním účinku astrocytózy na zranění mozku je přehledně shrnuto v review od Pekny, Wilhelmsson a Pekna (2014).



Obrázek 4 Srovnání mikrofotografií astrocytů s imunohistochemicky barveným GFAP. První snímek zachycuje astrocyty ve zdravé myši tkáni (A). Zbylé snímky zobrazují astrocyty při středně těžké (B) a těžké (C) reaktivní astrocytóze cerebrálního kortexu myši. Na snímku C je patrná oblast formování gliové jizvy (hranice oblasti označeny šipkami). Převzato a upraveno dle Sofroniew (2009).

3 SELEKCE ANIMÁLNÍCH MODELŮ

Během uplynulých desetiletí byla zavedena řada experimentálních modelů, jejichž cílem bylo co nejpresněji napodobit průběh ischemického insultu člověka a poskytnout tak půdu pro studie mechanismů ischemického poškození, zánětu a nových klinických intervencí. Experimenty jsou prováděny na dospělých malých či velkých zvířatech, přičemž každá z těchto kategorií má své přednosti i slabé stránky (viz dále). Výjimkou je výzkum perinatálního insultu, při kterém jsou majoritně užívána mláďata potkanů³.

3.1 Velké animální modely

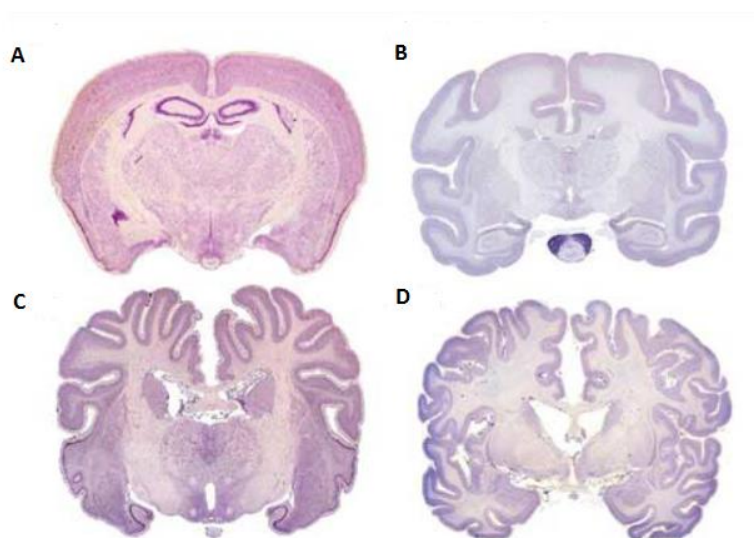
Nejčastěji využívanými velkými zvířaty jsou kočky, psi, primáti a prasata. Jejich předností je snadný monitoring fyziologických hodnot a dobrá snímatelnost pomocí zobrazovacích technik. Velká zvířata mají, stejně jako člověk, gyrencefalický mozek a jsou mu tak bližší ve strukturním a funkčnímu členění mozku (**Obrázek 5**). Obecně jsou tato zvířata vhodná zejména k testování metod endovaskulární rekanalizace (Fisher et al., 2009). Výhodou také je, že sestupné anatomické dráhy těchto zvířat (např. kortikospinální trakta) jsou inervována podobně jako u člověka (Courtine et al., 2007). Primáti a prasata jsou užíváni při výzkumu regenerace bílé hmoty (Fisher et al., 2009). Nevýhodou velkých animálních modelů je jejich značná nákladnost a limitovaná dostupnost (platí zejména pro primáty). Ischemický insult je u velkých zvířat většinou nutné navozovat i monitorovat invazivně, což skýtá riziko druhotného poranění mozku chirurgickým zákrokem. Velká zvířata navíc vykazují vyšší vnitrodruhovou variabilitu rozsahu poškození a infarktu v porovnání se zvířaty malými. Práci s velkými zvířecími modely ztěžují i přísná legislativní a etická ustanovení.

3.2 Malé animální modely

Malá zvířata jsou při preklinických studiích využívána nejčastěji. Radíme sem myši, potkany, pískomily či králíky. Jejich pořizovací cena i dlouhodobý chov nejsou pro příslušnou laboratoř přílišnou finanční zátěží. Výhodou je také poměrně nízká vnitrodruhová variabilita těchto zvířat, zejména pak hlodavců. Malý mozek se rychle a snadno fixuje pro potřebu další analýzy (Pontén, Ratcheson, Salford, & Siesjo, 1973). Manipulace s těmito zvířaty a péče o ně je relativně snadná. Malá zvířata jsou navíc mnohem lépe uskladnitelná než zvířata velká, a proto je možné jich na stejné ploše chovat mnohem větší počet. Experimenty prováděné na malých zvířatech jsou ve srovnání s velkými zvířaty méně časově náročné. V neposlední řadě jsou u malých zvířat dobře diagnostikovatelné neurosenzorické a neuromotorické deficity následující po iktu. Mezi negativa malých zvířat patří zejména lisencefalický typ mozku, jenž naznačuje odlišné strukturní

³ Pro účely výzkumu perinatálního insultu jsou převážně využívána 7 dní stará mláďata potkanů (zkráceně P7, angl. postnatal day 7). V tomto stádiu vývoje je histologie mozku mláďat potkanů srovnatelná s 32. – 34. týdnem gestačního období fetu a novorozencem (Vannucci et al., 1999). Ze stejného důvodu jsou využívána i mláďata P12 a P13, která jsou vývojově na úrovni novorozence narozeného v termínu.

uspořádání, než má lidský mozek (**Obrázek 5**). Potkan vykazuje podobnou cerebrální vaskulaturu a fyziologii jako člověk (Yamori, Horie, Handa, Sato, & Fukase, 1976), a proto je využíván ke studiu mechanismů ischemického insultu nejčastěji. Oproti tomu myš je vhodná zejména pro genetické modifikace, pomocí kterých je možné navodit knockout či overexpresi různých genů a sledovat jejich vliv na molekulární patofyziologii ischemického insultu (Fujimura et al., 1999).



Obrázek 5 Srovnání stupně gyrifikace mozku potkana (A), makaka rhesus (B), prasete (C) a člověka (D). Převzato a upraveno dle Howells a kol. (2010).

3.3 Výzvy spojené s převodem poznatků do praxe

Ač bylo pomocí experimentálních modelů získáno mnoho nových poznatků o ischemickém poškození mozku, je převod těchto poznatků do klinické praxe limitovaný. Řada léčiv a neuroprotektiv se osvědčila při preklinických studiích, jejich účinnost při klinických studiích však prokázána nebyla (Kaste, 2005). Hlavní příčinou zmíněného neúspěchu je pravděpodobně fakt, že žádný z doposud užívaných modelů přesně nereflektuje mechanismy poškození a neuroprotektce tak, jak probíhají u člověka. Modelová zvířata jsou většinou zdravá, mladá, bez medikace a ischemické poškození je u nich vyvoláváno standardizovanými metodami. Ischemická CMP člověka je oproti tomu značně variabilní a dochází k ní převážně v kontextu stárnutí, hypertenze, srdečních chorob, diabetu atd. Diskutována je také otázka spolupůsobení více léčiv (Shi, Morike, & Klotz, 2008). Na neúspěšném přenosu poznatků se též mohou podílet i metodické a administrativní aspekty klinických testování. Častým nedostatkem je například nevhodné načasování podání účinné látky či nižší dávkování léčiva z důvodu zajištění bezpečnosti pacienta.

Kvůli potřebě zvýšení konzistentnosti a reprodukovatelnosti experimentů byla Stroke Therapy Academic Industry Roundtable zavedena doporučení pro provádění preklinických testování. Mezi tato doporučení patří například to, že při signifikantní účinnosti léčiva na jednom druhu zvířete je třeba tento výsledek vždy verifikovat na jiném zvířecím druhu (Fisher et al., 2009).

4 MODEL Y ISCHEMICKÉHO POŠKOZENÍ MOZKU

4.1 Modely globální ischemie

4.1.1 Ischemie vyvolaná strangulací

Globální ischemie je navozena pomocí vysokotlaké vzduchové manžety umístěné na krku anestezizovaného zvířete. Nafouknutí manžety vyvolává bilaterální okluzi velkých krčních arterií a vén a dalších krčních struktur. Při správném provedení zaškrcení je hodnota krevního toku snížena až na méně než 1% oproti kontrole. Nevýhodou modelu je vysoká četnost záchvatů (Siemkowicz & Hansen, 1978). V posledních letech nepříliš často využívaný model.

4.1.2 Modely využívající ventrikulární fibrilaci

Modely využívající srdeční zástavu jsou vhodné zejména ke studiu mechanismů opožděné buněčné smrti neuronů a k posouzení účinku neuroprotektivních látek. Řadíme sem ventrikulární fibrilaci (zkráceně VF) střídavým proudem a injekcí kardioplegik.

Model VF střídavým proudem se vyznačuje rychlým poklesem tlaku a pulzu a velmi dobře tak napodobuje klinický projev srdeční zástavy člověka. Metoda dle von Planta a kol. (1988) zahrnuje indukci fibrilace střídavým proudem do pravého ventrikulárního endokardia anestezizovaných potkanů. Zvířata jsou po specifikované době kardiopulmonálně resuscitována. Nevýhodou tohoto typu VF je komplikovaná procedura a tepelné poranění srdce v místě elektrod, které je pravděpodobně zodpovědné za vysokou úmrtnost zvířat (přibližně 43%) (von Planta et al., 1988). Nedávno navržená modifikace modelu navozuje srdeční zástavu pomocí nižšího elektrického impulzu a vykazuje nižší úmrtnost potkanů (Dave, Della-Morte, Saul, Prado, & Perez-Pinzon, 2013).

Druhou možností vyvolání VF je intraventrikulární injekce KCl, či jiného kardioplegika, přes jugulární katetr. Při správné aplikaci kardioplegika je možné sledovat okamžitý pokles průměrného arteriálního krevního tlaku. Po několika minutách globální ischemie jsou zvířata kardiopulmonálně resuscitována. Výhodou metody je minimální chirurgický zásah, dobře pozorovatelné postinsultové behaviorální změny a produkce lézí na mnoha místech mozku. Model je klinicky relevantní. Nevýhodou je komplikovaná procedura a fakt, že jen velmi málo zvířat přežívá déle než dva dny po resuscitaci (Kofler et al., 2004).

4.1.3 Model okluze čtyř cév

Model okluze čtyř cév (angl. four-vessel occlusion, zkráceně 4-VO) je velmi často užíván k produkci reverzibilní ischemie předního mozku u potkanů. Principem této metody je vratná

bilaterální okluze *arteriae carotides communes* kombinovaná s elektrokauterizací *arteriae vertebrales* na neanestetizovaných potkanech ústící v bilaterální hemisférickou ischemii. Okluze *arteriae carotides communes* je dosaženo pomocí atraumatických svorek, jež jsou po definované době vyjmuty, a je posuzována úroveň vědomí zvířat. Poškození mozku se odvíjí od délky trvání ischemie s nevýraznějším efektem v oblasti hippocampu, neokortexu a striatu. Velkou předností modelu je pravděpodobně neanestetizace potkanů. Další výhodou je nízká incidence záchvatů a velmi dobře predikovatelná lokalita poškození (Pulsinelli & Brierley, 1979). Nevýhodou modelu 4-VO dle Pulsinelli a kol. (1979) je zejména riziko nesprávného technického provedení elektrokauterizace *arteriae vertebrales*, jenž může zkreslit výsledky experimentů. Je nutno zmínit, že se rozsah poškození u jednotlivých druhů potkanů výrazně liší. Tento jev je přisuzován rozdílům v kolaterální vaskulatuře mezi plemeny (Pulsinelli & Buchan, 1988; Pulsinelli & Brierley, 1979). Model 4-VO byl v průběhu let dále modifikován. Většina těchto modifikací byla zacílena na zvýšení počtu potkanů, kteří po rekanalizaci vykazují kompletní a dlouhotrvající ztrátu vestibulárního reflexu (Pulsinelli & Buchan, 1988; Pulsinelli, Levy, & Duffy, 1983). Výraznou obměnou metody je přechod z dvoufázové techniky na techniku jednofázovou (Atlasi, Naderian, Nouredini, Fakharian, & Azami, 2013). Tento model nachází svoje uplatnění například při studiu účinku neuroprotektiv.

4.1.4 Model okluze tří cév

Model okluze tří cév (angl. three-vessel occlusion, zkráceně 3-VO) vznikl ve snaze vyhnout se dřívějšímu výraznému nedostatku 4-VO modelu, jímž byla nemožnost verifikace kompletní elektrokauterizace *arteriae vertebrales*. Dvoukrokový zákrok se skládá z okluze *arteria basilaris* a dočasné bilaterální okluze *arteriae carotides communes* potkana. Okluzi *arteria basilaris* je možno vizuálně zkontrolovat. Procedura se provádí buď samostatně, nebo v kombinaci s ligací krku. V obou případech dochází k výraznému a konstantnímu snížení krevního toku mozkem. Předností modelu je velmi dobrá reprodukovatelnost zranění. Při plánování vlastního experimentu je třeba vzít v úvahu, že ligace krku může podrážděním *nervus vagus* vyvolat poruchy autonomního nervového systému (Kameyama, Suzuki, Shirane, & Ogawa, 1985). Studie poukazují na opožděnou buněčnou smrt kortikálních a striálních neuronů ve srovnání s neurony hippocampu po aplikaci 3-VO modelu (Thal, Thal, & Plesnila, 2010). Model je možno uplatnit například při studiu mechanismů ischemického insultu a poranění vyvolaného reperfuzí.

4.1.5 Model okluze dvou cév

Model okluze dvou cév (angl. two-vessel occlusion, zkráceně 2-VO) je, podobně jako 4-VO model, zacílen na vyvolání reverzibilní ischemie předního mozku na anestetizovaných potkanech. K navození globální ischemie dochází pomocí bilaterální okluze *arteriae carotides communes* svorkami ve spojení se systémovou hypotenzí, které je dosaženo snížením průměrného arteriálního krevního tlaku na 50 mm Hg. Tlak je snížen krvácením či aplikací periferních vasodilatátorů.

Poškození vyvolané ischemií předního mozku zasahuje především selektivně citlivé oblasti, jako jsou struktury neokortexu, pyramidové neurony CA1 hippocampu a striatum (Eklöf & Siesjö, 1972; Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosen I, Wieloch T, 1984). Výhodou modelu je rychlý nástup ischemie i reperfuze. Model 2-VO je ve srovnání s 4-VO modelem procedurálně jednodušší, méně invazivní a navíc plně reverzibilní. Nevýhodou je nutnost hypotenze a anestezizace zvířat. Model byl v průběhu let několikrát modifikován (McBean et al., 1995; Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosen I, Wieloch T, 1984). Podobně jako 4-VO model je tento model využíván při výzkumu neuroprotektivních látek.

4.2 Modely fokální ischemie

Nejčastěji užívanou metodou vyvolání fokální ischemie je okluze *arteria cerebri media*. Je tomu tak z důvodu klinické relevance, jelikož ischemické insuly lidských pacientů jsou nejčastěji vyvolány právě embolickou či trombotickou okluzí této tepny (Olsen, Skriver, & Herning, 1985). U většiny podtypů okluze *arteria cerebri media* je možno pozorovat vznik ischemické penumbry strukturně podobné penumbře u lidí. Obecně jsou zvláště mechanické okluze *arteria cerebri media* snadno proveditelné a vedou ke vzniku reprodukovatelných lézí. Užívaná je i okluze *arteria carotis communis*, a to samostatně či v kombinaci se systémovou hypoxií.

4.2.1 Okluze *arteria carotis communis*

Unilaterální či bilaterální okluze *arteria carotis communis* je u pískomilů, na rozdíl od většiny ostatních modelových zvířat, dostačující k vyvolání fokální ischemie. Příčinou je neúplný a funkčně odlišný *circulus arteriosus cerebri* pískomilů (Levine & Payan, 1966; Suzuki, Yamaguchi, Kirino, Orzi, & Klatzo, 1983). Okluze *arteriae carotides communes* je provedena pomocí chirurgických svorek na neanestetizovaném zvířeti. Zranění je pozorováno především v oblasti striatu a hippocampu, přičemž pozoruhodná je především opožděná buněčná smrt CA1 neuronů (Chesselet, Gonzales, Lin, Polsky, & Jin, 1990; Suzuki et al., 1983). Nevýhodou je variabilní dopad poškození vyžadující monitoring každého zvířete. Jako možné negativum se zdá být obecně vysoká četnost epileptických záchvatů u pískomilů. Nebylo ale prokázáno, že by tyto záchvaty měly jakýkoliv vliv na dopad ischemického insultu (Herrmann, Stern, Vollenweider, & Nitsch, 2004). Model je oceňován zejména v oblasti studia prahových hodnot krevního toku ve vztahu k narušení funkčních a biochemických drah (Paschen, Djuricic, Bosma, & Hossmann, 1983).

4.2.2 Hypoxicko-ischemická encefalopatie

Tento model využívá kombinovaného účinku ischemie a anoxie k produkci fokálních cerebrálních unilaterálních lézí u potkanů. Metoda dle Levine (1960) na dospělých potkanech zahrnuje jednostrannou ligaci *arteria carotis communis*, po které následuje anoxie vyvolaná inhalací dusíku či NO. Nejvýraznější léze je možno pozorovat v oblasti šedé hmoty hippocampu (Levine, 1960).

Ač měl tento model původně sloužit ke zjištění obecné vnímavosti šedé a bílé hmoty vůči anoxicko-ischemickému poškození, později začal být aplikován především ve výzkumu perinatálního insultu. Rice a kol. (1981) aplikoval metodu dle Levine (1960) na mláďata potkanů P7. Výsledkem je dobře reprodukovatelné poškození, které je vyvoláno až u 90% přeživších jedinců. Poškozen je především ipsilaterální kortex, striatum a hippocampus (Rice, Vannucci, & Brierley, 1981). Procedura dle Levine (1960) zůstala zachována a do dnešní doby prošla pouze drobnými modifikacemi (Xu et al., 2015). Upravený model hypoxicko-ischemické encefalopatie dle Rice a kol. (1981) je vhodný ke studiu plasticity mozku a odlišností mezi poškozením mozku mláďat a dospělců. Používán je i k testování nových klinických intervencí v oblasti perinatálního insultu.

4.2.3 Mechanické okluze *arteria cerebri media*

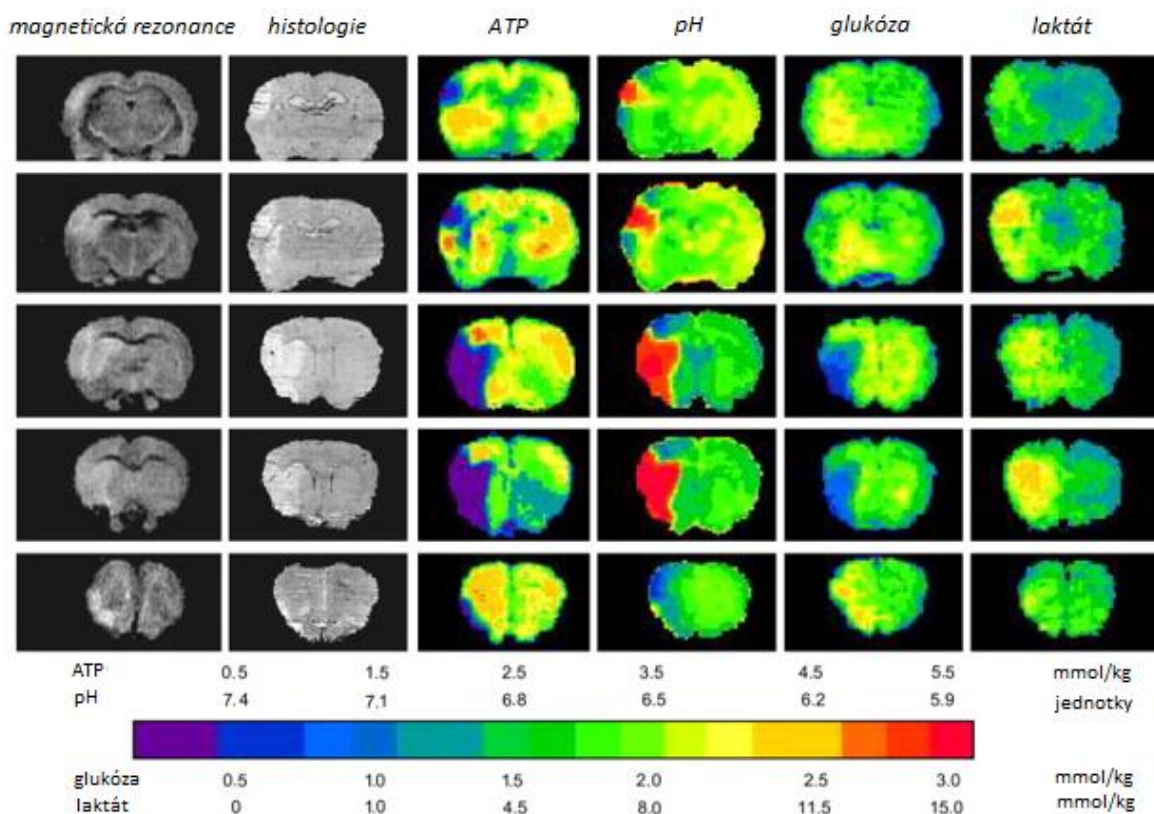
Tamura a kol. (1981) zavedl okluzi *arteria cerebri media* pomocí chirurgických svorek. Okluze je provedena pomocí malé subtemporální kraniektomie u potkana. Léze jsou pozorovány v oblasti kortexu a bazálních ganglií. Nevýhodou je chirurgická invazivita metody, která může zapříčinit infekci, subarachnoidální krvácení či únik cerebrospinální tekutiny. Výhodou metody je její nenáročné provedení, reprodukovatelnost a tvorba konzistentních lézí (Tamura, Graham, McCulloch, & Teasdale, 1981).

Rozšířenou se stala i okluze *arteria cerebri media* ligací, která stejně jako okluze svorkami vyžaduje kraniektomii. Mimo ligace pravé *arteria cerebri media* zahrnuje i bilaterální ligaci *arteriae carotides communes*. Metoda se vyznačuje tvorbou konzistentních lézí v oblasti kortexu a bazálních ganglií a dále nízkou mortalitou (Chen, Hsu, Hogan, Maricq, & Balentine, 1986).

Další z možností je okluze *arteria cerebri media* elektrokoagulací. Stejně jako obě předcházející metody vyžaduje kraniektomii. Pokud je kauterizace provedena v úseku *arteria cerebri media* distálně vůči lentikulostriatálním artériím, je poškozen kortex, zatímco je-li arterie kauterizována proximálně od nich, dochází k poškození nejen v oblasti kortexu, ale i striatu (Brint, Jacewicz, Kiessling, Tanabe, & Pulsinelli, 1988).

Okluze *arteria cerebri media* intraluminálním vláknem nevyžaduje na rozdíl od ostatních mechanických modelů okluze této cévy kraniektomii. Arterie je okludována pomocí nylonového vlákna, jež je nejčastěji vedeno kanylou přes *arteria carotis interna* (Longa, Weinstein, Carlson, & Cummins, 1989). Nejedná se o složitou techniku, její chybné provedení ovšem skýtá riziko subarachnoidální hemoragie či hypertermie (Li, Omae, Fisher, Dietrich, & Kuluz, 1999). Intraluminální okluze *arteria cerebri media* dobře napodobuje ischemický insult člověka a vyvolává i strukturně podobnou ischemickou penumbru. Od klinického ischemického insultu jej odlišuje poškození arterií během vložení vlákna. Velikost a reprodukovatelnost lézí vznikajících v oblasti frontoparietálního kortexu a striatu se odvíjí od velikosti užitého vlákna (Türeyen,

Vemuganti, Sailor, & Dempsey, 2005). Výhodou je zejména možnost kdykoliv vlákno vyjmout a navodit rychlou reperfuzi. Metoda byla dále modifikována za cílem zvýšení reprodukovatelnosti zranění. Mezi tyto modifikace patří například pokrytí vlákna vrstvou poly-L-lysinu, která zlepšuje přilnutí vlákna k cévnímu endotelu (Belayev, Busto, Zhao, & Ginsberg, 1996). Model je vhodný pro studie zaměřené na opožděnou buněčnou smrt neuronů po ischemii, poškození hematoencefalické bariéry a behaviorální a zánětlivé postischemické změny.



Obrázek 6 Multiparametrové zobrazení akutní cerebrální ischemie způsobené okluzí *arteria cerebri media* u potkana. Porovnat je možné snímky pořízené magnetickou rezonancí s histologickými snímky pořízenými *post mortem* a snímky zachycujícími obsah metabolitů v tkáni a její pH. Převzato a upraveno dle Back a kol. (1994).

4.2.4 Embolické okluze *arteria cerebri media*

Embolické modely dělíme na embolie kuličkami z umělého materiálu a tromboembolie. Společným kladem obou podtypů embolických modelů je jejich značná klinická relevance. Několik hodin po zákroku je možné pozorovat předčasnou spontánní reperfuzi způsobenou endogenní trombolýzou, extravazací sraženiny či vymýváním trombu.

Tromboembolické modely jsou založeny na principu vyvolání embolie pomocí přirozeně či uměle zformované autologní krevní sraženiny. Embolismy byly zpočátku vyvolávány injekcí sraženiny přes extrakraniální segment *arteria cerebri interna*. Negativem této procedury je nízká uniformita ve velikosti a lokalizaci lézí (Overgaard et al., 1992). Tento jev je zapříčiněn nedostatečnou

kontrolou lokalizací okluze *arteria cerebri media*. Místo okluze *arteria cerebri media* je klíčovým determinantem velikosti vznikajících infarktů (Shiino, Harada, & Handa, 1989). Model Zhang a kol. (1997) zmíněný problém překonal vložení embolu obohaceného fibrinem do segmentu intrakraniální *arteria cerebri interna* 2 – 3 mm proximálně od počátku *arteria cerebri media*. Pomocí této techniky se reprodukovatelnost zranění mnohonásobně zvýšila (Zhang, Chopp, Zhang, Jiang, & Ewing, 1997). Postupem času byly popsány další modifikované modely (Atochin et al., 2004; Busch, Kruger, & Hossmann, 1997), model Zhang et al. (1997) byl však i přesto dlouhou dobu upřednostňován. Nejnovějším a velmi slibným tromboembolickým modelem je model Chen a kol. (2015). Tento model vykazuje v porovnání s ostatními tromboembolickými modely markantní snížení délky trvání procedury a úmrtnosti zvířat. Jeho aplikací je možno dosáhnout takřka uniformních lézí s dobře predikovatelnou lokalizací (Chen et al., 2015). Tromboembolické modely velmi blízce napodobují převládající mechanismy vaskulární okluze u lidí a jsou vhodné pro testování kombinovaného účinku neuroprotektiv a trombolitik (Zhang, Zheng, Zhang, Rui, & Chopp, 2004). Své využití mohou najít i při studiích zaměřených na patofyziologické mechanismy ischemického insultu a postinsultové terapie.

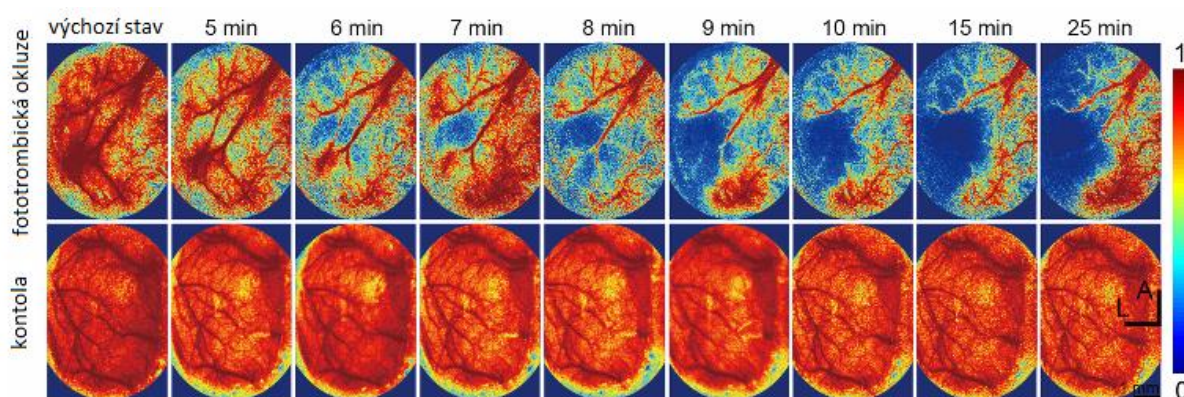
Druhou možností je vyvolání embolie *arteria cerebri media* pomocí kuliček o přesně definovaném poloměru. Kuličky jsou tvořeny umělým deformním materiálem, jenž se chová jako uměle vytvořený embolus. Používanými látkami jsou například silikon, kolagen či polyvinylsiloxan (Lauer et al., 2002; Purdy et al., 1989; Yang, Yang, Li, Wang, & Shuaib, 2002). Kuličky jsou injikovány do *arteria cerebri interna* či do *arteria carotis communis*. Použijeme-li makrokuličky s poloměrem větším než 300 µm, projev embolie dobře napodobuje projev permanentní okluze *arteria cerebri media* (Gerriets et al., 2003). Za použití mikrokuliček s poloměrem menším než 50 µm je možno vyvolat malé multifokální infarkty (Miyake, Takeo, & Kaijihar, 1993). Embolie vyvolaná kuličkami z umělých materiálů je podobně jako tromboembolie vhodná ke studiím zaměřeným na mechanismy ischemického insultu a nové klinické intervence.

4.2.5 Fototrombotická okluze

Fototrombotická okluze je využívána ke tvorbě dobře reprodukovatelných fokálních kortikálních lézí. Základem metody je intravenózní aplikace fotosenzitivního barviva (např. Rose Bengal, erythrosin B) a několikaminutové osvětlení cílové oblasti mozku anestezovaného zvířete světelným paprskem o specifické vlnové délce. Fotooxidace barviva vede k tvorbě ROS, poškození endotelu, aktivaci trombocytů a vzniku krevních sraženin (Watson, Dietrich, Busto, Wachtel, & Ginsberg, 1985). Hlavní výhodou metody je možnost selekce oblasti, v níž chceme indukovat poranění. Dalším pozitivem je nízká invazivita metody. Chirurgický zásah není nutný, jelikož paprsek prochází lebkou zvířete. Za klad metody je taktéž považována minimální úmrtnost zvířat a velmi dobrá reprodukovatelnost vznikajících lézí (Watson et al., 1985). Nevýhodou modelu je již samotná povaha poškození, která současnou tvorbou vazogenního a cytotoxického edému více připomíná průběh traumatického poranění mozku než fokálního ischemického insultu (Schneider

et al., 2002). Tato odlišnost se odráží i v malé ploše ischemické penumbry a může být způsobena časným rozpadem hematoencefalické bariéry (Dietrich, Busto, Watson, Scheinberg, & Ginsberg, 1987). K ischemickému insultu u člověka navíc dochází většinou po ucpání velké tepny, zatímco procesem fotooxidace se okludují všechny cévy osvětlené oblasti.

Fototrombotická okluze prováděná na potkanech byla rozšířena i na další zvířata, jako je například myš či kočkodan (Ikeda et al., 2013; Lee et al., 2007). Poměrně nedávno byla zavedena modifikace, při níž není třeba zvířata anestetizovat, čímž je eliminována možná interference anestetik (Lu et al., 2014). Další modifikací je použití cirkulárního laseru ke tvorbě prstencových lézí s centry o charakteru ischemické penumbry (Hu, Wester, Brännström, Watson, & Gu, 2001). Z výše uvedených důvodů není fototrombotická okluze vhodná k testování účinku neuroprotektivních látek, jejichž cílem jsou buňky ischemické penumbry. Své využití nachází tento model při studiu molekulárních zánětlivých mechanismů, u studií zaměřených na postischemické behaviorální změny, a také při výzkumu látek zacílených na modulaci odpovědi trombocytů na poškození cévního endotelu (Frederix et al., 2007; C. Kleinschnitz et al., 2008).

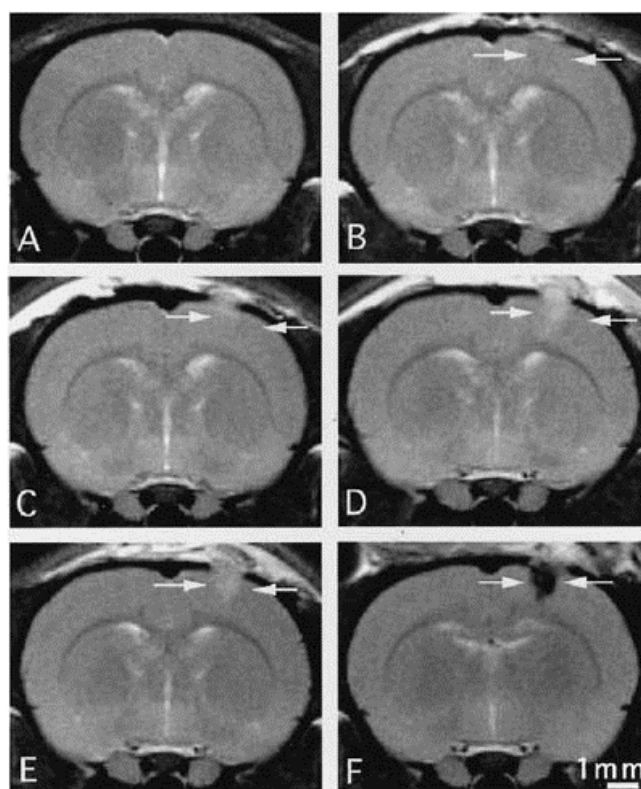


Obrázek 7 Změny v cerebrálním krevním toku před (výchozí stav) a po 5 až 25 minutách od iniciace fototrombotické okluze. Pro přehlednost je uvedeno srovnání s kontrolou. Převzato a upraveno dle Lu a kol. (2014).

4.2.6 Aplikace endotelinu 1

Endotelin 1 (zkráceně ET-1) je izopeptid s výrazným a dlouhotrvajícím vazokonstrikčním účinkem. Je produkován cévním endotelem a spojován s řadou vaskulárních chorob (Yanagisawa, Kurihara, Kimura, Goto, & Masaki, 1988). Při experimentálním vyvolání fokální ischemie pomocí ET-1 existuje více možností, jak jej aplikovat. ET-1 může být injikován do blízkosti *arteria cerebri media*, intrakortikálně, intrastriálně či intrakortikálně a intrastriálně současně. Všechny jmenované způsoby vpravení ET-1 vedou k formování lézí v oblasti motorického kortexu a striatu, vzájemně se však liší svojí účinností (Fuxe et al., 1992; Fuxe et al., 1997; Sharkey, Ritchie, & Kelly, 1993; Windle et al., 2006). Nejvyšší účinnost ve vyvolání lézí vykazuje kombinace kortikální a striální aplikace ET-1 (Windle et al., 2006). Lokální vazokonstrikce vyvolaná ET-1

mikroinjekčně vpraveného do blízkosti *arteria cerebri media* způsobuje vznik lézí srovnatelných s lézemi indukovanými mechanickou okluzí této artérie (Macrae, Robinson, Graham, Reid, & McCulloch, 1993; Sharkey et al., 1993). Výhodou endotelinového modelu je možnost vyvolání ischemie v libovolné části mozku. Ceněná je také nepříliš invazivní technika a nízká úmrtnost operovaných potkanů. Výrazným omezením modelu je, že receptory pro ET-1 a ET-1 konvertující enzymy jsou exprimovány i astrocyty (Nakagomi, Kiryu-Seo, & Kiyama, 2000). Aplikace ET-1 může vyvolat astrocytózu a ovlivnit tak interpretaci výsledků experimentů (Uesugi, Kasuya, Hayashi, & Goto, 1998). Model je vhodný k hodnocení účinnosti neuroprotektivních látek při preklinických testech a ke studiím zabývajícím se obnovami nervových funkcí u dospělých potkanů a mláďat P12 (Windle et al., 2006).



Obrázek 8 Snímky pořízené magnetickou rezonancí ukazující změny nervové tkáně potkana před aplikací ET-1 (A), půl hodiny (B), 4 hodiny (C), 24 hodin (D) a sedm dní (F) po aplikaci ET-1. Ze snímků je patrné, že původně homogenní bilaterální signál (A) postupem času v místě aplikace ET-1 ztrácí svoji intenzitu (označeno šipkami) a znázorňuje tak postupnou formaci léze. Převzato a upraveno dle Fuxe a kol. (1992).

Tabulka 2 Shrnutí hlavních experimentálních modelů ischemického poškození mozku. Uvedeny jejich klíčové výhody modelů a výzkumná oblast, v níž jsou nejčastěji užívány.

Název modelu	Hlavní výhody modelu	Nejčastěji aplikace v oblasti
Strangulací vyvolaná ischemie	<ul style="list-style-type: none"> o značné snížení krevního toku o nenáročná procedura 	<ul style="list-style-type: none"> o vývoj neuroprotektiv
Modely srdeční zástavy	<ul style="list-style-type: none"> o verifikace na velkých zvířatech o nízká invazivita o multifokální léze o klinicky relevantní 	<ul style="list-style-type: none"> o opožděná buněčná smrt neuronů o vývoj neuroprotektiv
Model okluze čtyř tepen	<ul style="list-style-type: none"> o verifikace na velkých zvířatech o anestezie není nutná o nízká incidence záchvatů o predikovatelná lokalizace lézí 	<ul style="list-style-type: none"> o vývoj neuroprotektiv
Model okluze tří tepen	<ul style="list-style-type: none"> o dobrá reprodukovatelnost o verifikace okluze arterie o konstantní snížení krevního toku 	<ul style="list-style-type: none"> o patofyziologie ischemického insultu o poranění při reperfuzi
Model okluze dvou tepen	<ul style="list-style-type: none"> o verifikace na velkých zvířatech o rychlý nástup reperfuze o nízká invazivita o plně reverzibilní 	<ul style="list-style-type: none"> o vývoj neuroprotektiv
Okluze arteria carotis communis	<ul style="list-style-type: none"> o není nutná anestezie o nenáročná procedura 	<ul style="list-style-type: none"> o vliv různých hodnot krevního toku na integritu biochemických drah
Hypoxicko-ischemická encefalopatie	<ul style="list-style-type: none"> o reprodukovatelnost o nenáročná procedura 	<ul style="list-style-type: none"> o studie perinatálního insultu a souvisejících klinických intervencí
Mechanické okluze arteria cerebri media	<ul style="list-style-type: none"> o verifikace na velkých zvířatech o nenáročná procedura o reprodukovatelnost o přítomnost ischemické penumbry o řada modifikací 	<ul style="list-style-type: none"> o studie opožděné smrti neuronů o mechanismy poškození HB o behaviorální a zánětlivé postischemické změny
Embolické okluze arteria cerebri media	<ul style="list-style-type: none"> o predikovatelnost umístění lézí o klinicky relevantní o aplikace neuroprotektiv a trombolitik možná současně 	<ul style="list-style-type: none"> o patofyziologie ischemického insultu o rekanalizační terapie
Endotelin 1 model	<ul style="list-style-type: none"> o volitelná lokalizace lézí o nízká invazivita o nízká úmrtnost zvířat o více způsobů aplikace látky 	<ul style="list-style-type: none"> o studie obnovy nervových funkcí o vývoj neuroprotektiv
Fototrombotická okluze	<ul style="list-style-type: none"> o verifikace na velkých zvířatech o volitelná lokalizace lézí o nízká invazivita o nízká úmrtnost zvířat o reprodukovatelnost o anestezie není nutná 	<ul style="list-style-type: none"> o studium mechanismů zánětu o behaviorální postischemické změny o modulace odpovědi trombocytů na poškození endotelu cév

5 ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byla provedena literární rešerše relevantních zdrojů. Vzhledem k nedostatku česky psané literatury vztahující se k tomuto tématu bylo čerpáno pouze ze zahraničních zdrojů. Zahraniční zdroje byly získávány převážně z relevantních databází odborných časopisů (PubMed, Web of Science, Scopus).

Kapitola 1 se zabývala ischemickou a hemoragickou cévní mozkovou příhodou, rizikovými faktory a neurobiologií ischemického poškození. Poznatkem plynoucím z rešerše literatury je, že otázka rizikových faktorů a jejich relativních příspěvků na vznik tohoto onemocnění ještě není zcela objasněna.

Důležitým aspektem studia ischemické cévní mozkové příhody je rozbor molekulárních mechanismů poškození mozku. Toto téma je poměrně podrobně zkoumáno, což se odráží v množství dostupné literatury. Z této literatury vyplývá, že rozsah poškození mozku se odvíjí především od délky trvání ischemie, zasažené oblasti a míry omezení krevního toku. Zároveň ze studií plyne, že podíl na poškození mozku mají taktéž zánětlivé změny, k nimž dochází následně po ischemické cévní mozkové příhodě. Tato problematika byla shrnuta v kapitole 2.

Třetí kapitola pojednává o výběru animálních modelů. Specifika výběru živočišných druhů jsou důležitá zejména, protože jsou jednotlivé živočišné druhy vhodné pro různé druhy experimentů. Důležitým hlediskem výběru laboratorního zvířete je taktéž finanční zátěž a přísnost legislativních ustanovení regulujících jejich chov.

Hlavní částí bakalářské práce, shrnuté ve čtvrté kapitole, bylo studium experimentálních modelů ischemického poškození mozku. Na základě kritéria dostupnosti bylo z desítek modelů vybráno 11 nejpoužívanějších experimentálních modelů. Byly vyhledány původní formy jednotlivých modelů a jejich pozdější modifikace. Nebylo možné najít absolutní kritérium hodnocení všech experimentálních modelů, a to vzhledem k jejich odlišné podstatě. Přesto byly vyhodnoceny vlastnosti modelů, jež bylo možné považovat za přednosti a slabé stránky. Poznatky shrnující nejvýznamnější výhody modelů byly v závěru kapitoly pro přehlednost shrnuty v tabulce společně s oblastí jejich nejčastější aplikace. Za přednost modelu je považována například možnost verifikace výsledků experimentů na velkém zvířeti, nenáročná procedura či nízká úmrtnost laboratorních zvířat.

Při sledování historického vývoje jednotlivých modelů bylo vypořádováno, že trend vývoje modelů vede k jejich postupnému zdokonalování. Tento fakt se odráží například v podobě dobré reprodukovatelnosti vyvolaného zranění a ve snižování invazivity novějších experimentálních procedur. Existuje tak reálná možnost, že bude v budoucnu klinická relevance experimentálních modelů na výrazně lepší úrovni.

Budoucí výzkum bude nepochybně směřován na další obměny experimentálních modelů ve snaze lépe napodobit podmínky a příčiny ischemického insultu. K modifikacím modelů bude pravděpodobně docházet díky moderním technikám a zobrazovacím metodám umožňujícím další zvyšování preciznosti procedur a lepší manipulaci s laboratorním zvířetem s cílem dalšího přiblížení experimentálních modelů k reální klinické situaci.

6 Seznam použité literatury

Hvězdičkou je v seznamu literatury označena sekundární literatura.

- Adams, H. P., Bendixen, B. H., Kappelle, L. J., Biller, J., Love, B. B., Gordon, D. L., & Marsh, E. E. (1993). Classification of subtype of acute ischemic stroke: Definitions for use in a multicenter clinical trial. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 24(1), 35–41. <http://doi.org/10.1161/01.STR.24.1.35>
- Andersen, K. K., Olsen, T. S., Dehlendorff, C., & Kammersgaard, L. P. (2009). Hemorrhagic and ischemic strokes compared: Stroke severity, mortality, and risk factors. *Stroke*, 40(6), 2068–2072. <http://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.540112>
- * Ariesen, M. J., Claus, S. P., Rinkel, G. J. E., & Algra, A. (2003). Risk factors for intracerebral hemorrhage in the general population: A systematic review. *Stroke*, 34, 2060–2065. <http://doi.org/10.1161/01.STR.0000080678.09344.8D>
- Astrup, J. K., Siesjö, B., & Symon, L. (1981). Thresholds in Cerebral Ischemia: The Ischemic Penumbra. *Stroke*, 12(6), 723–725. <http://doi.org/doi:10.1161/01>
- Atlasi, M. A., Naderian, H., Nouredini, M., Fakharian, E., & Azami, A. (2013). Morphology of Rat Hippocampal CA1 Neurons Following Modified Two and Four-Vessels Global Ischemia Models. *Archives of Trauma Research*, 2(3), 124–128. <http://doi.org/10.5812/at.10240>
- Atochin, D. N., Murciano, J. C., Gursoy-Ozdemir, Y., Krasik, T., Noda, F., Ayata, C., Dunn, A. K., Moskowitz, M. A., Huang, P. L., Muzykantov, V. R. (2004). Mouse model of microembolic stroke and reperfusion. *Stroke*, 35(9), 2177–2182. <http://doi.org/10.1161/01.STR.0000137412.35700.0e>
- Back, T., Hoehn-Berlage, M., Kohno, K., & Hossmann, K. A. (1994). Diffusion nuclear magnetic resonance imaging in experimental stroke. Correlation with cerebral metabolites. *Stroke*, 25(2), 494–500. <http://doi.org/10.1161/01.STR.25.2.494>
- * Barone, F. C., Arvin, B., White, R. F., Miller, A., Webb, C. L., Willette, R. N., Lysko, P. G., Feuerstein, G. Z. (1997). Tumor Necrosis Factor- α : A Mediator of Focal Ischemic Brain Injury. *Stroke*, 28(6), 1233–1244. <http://doi.org/10.1161/01.STR.28.6.1233>
- Belayev, L., Busto, R., Zhao, W., & Ginsberg, M. D. (1996). Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Research*, 739(1-2), 88–96. [http://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)00815-3](http://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)00815-3)
- Boveris, A., & Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, 134(3), 707–716. <http://doi.org/10.1042/bj1340707>
- Brint, S., Jacewicz, M., Kiessling, M., Tanabe, J., & Pulsinelli, W. (1988). Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 8(4), 474–485. <http://doi.org/10.1038/jcbfm.1988.88>
- Busch, E., Kruger, K., & Hossmann, K. A. (1997). Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Research*, 778(1), 16–24. [http://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01008-1](http://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01008-1)
- Campbell, S. J., Hughes, P. M., Iredale, J. P., Wilcockson, D. C., Waters, S., Docagne, F., Hugh Perry, V., Anthony, D. C. (2003). CINC-1 is an acute-phase protein induced by focal brain injury causing leukocyte mobilization and liver injury. *The FASEB Journal*, 17(9), 1168–1170. <http://doi.org/10.1096/fj.02-0757fje>

- Cao, W., Carney, J. M., Duchon, A., Floyd, R. A., & Chevion, M. (1988). Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. *Neuroscience Letters*, 88(2), 233–238. [http://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90132-2](http://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90132-2)
- Clark, R. K., Lee, E. V., Fish, C. J., White, R. F., Price, W. J., Jonak, Z. L., Feuerstein, G. Z., & Barone, F. C. (1993). Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: An immunohistochemical and quantitative planimetric study. *Brain Research Bulletin*, 31(5), 565–572. [http://doi.org/10.1016/0361-9230\(93\)90124-T](http://doi.org/10.1016/0361-9230(93)90124-T)
- * Courtine, G., Bunge, M. B., Fawcett, J. W., Grossman, R. G., Kaas, J. H., Lemon, R., Maier, I., Martin, J., Nudo, R. J., Ramon-Cueto, A., Rouiller, E. M., Schnell, L., Wannier, T., Schwab, M. E., & Edgerton, V. R. (2007). Can experiments in nonhuman primates expedite the translation of treatments for spinal cord injury in humans? *Nature Medicine*, 13(5), 561–566. <http://doi.org/10.1038/nm1595>
- Dave, K. R., Della-Morte, D., Saul, I., Prado, R., & Perez-Pinzon, M. A. (2013). Ventricular Fibrillation-Induced Cardiac Arrest in the Rat as a Model of Global Cerebral Ischemia. *Translational Stroke Research*, 4(5), 571–578. <http://doi.org/10.1007/s12975-013-0267-0>
- Davies, S. J. A., Fitch, M. T., Memberg, S. P., Hall, A. K., Raisman, G., & Silver, J. (1997). Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature*, 390(6661), 680–683. <http://doi.org/10.1038/37776>
- Del Bigio, M. R., Yan, H.-J., Buist, R., & Peeling, J. (1996). Experimental Intracerebral Hemorrhage in Rats: Magnetic Resonance Imaging and Histopathological Correlates. *Stroke*, 27, 2312–2320. <http://doi.org/10.1161/01.STR.27.12.2312>
- Dietrich, W. D., Busto, R., Watson, B. D., Scheinberg, P., & Ginsberg, M. D. (1987). Photochemically induced cerebral infarction: II. Edema and blood-brain barrier disruption. *Acta Neuropathologica*, 72(4), 326–334. <http://doi.org/10.1007/BF00687263>
- * Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*, 27, 519–50. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>
- * Dirnagl, U., Iadecola, C., & Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, 22(9), 391–397. [http://doi.org/10.1016/S0166-2236\(99\)01401-0](http://doi.org/10.1016/S0166-2236(99)01401-0)
- Eklöf, B., & Siesjö, B. K. (1972). The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and the energy state of the rat brain. *Acta Physiologica Scandinavica*, 86(2), 155–65. <http://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1972.tb05322.x>
- Fabricsius, M., Fuhr, S., Bhatia, R., Boutelle, M., Hashemi, P., Strong, A. J., & Lauritzen, M. (2006). Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex. *Brain*, 129(3), 778–790. <http://doi.org/10.1093/brain/awh716>
- * Fisher, M., Feuerstein, G., Howells, D. W., Hurn, P. D., Kent, T. A., Savitz, S. I., & Lo, E. H. (2009). Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke*, 40(6), 2244–2250. <http://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.541128>
- Frederix, K., Chauhan, A. K., Kisucka, J., Zhao, B.-Q., Hoff, E. I., Spronk, H. M. H., ten Cate, H., Wagner, D. D. (2007). Platelet adhesion receptors do not modulate infarct volume after a photochemically induced stroke in mice. *Brain Res.*, 1185, 239–245. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.07.103>

- Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., Kawase, M., Copin, J., Calagui, B., Epstein, C. J., & Chan, P. H. (1999). Manganese Superoxide Dismutase Mediates the Early Release of Mitochondrial Cytochrome C and Subsequent DNA Fragmentation after Permanent Focal Cerebral Ischemia in Mice. *The Journal of Neuroscience*, 19(9), 3414–3422.
- Fuxe, K., Bjelke, B., Andbjør, B., Grahn, H., Rimondini, R., & Agnati, L. F. (1997). Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia. *Neuroreport*, 8(11), 2623–2629. <http://doi.org/10.1097/00001756-199707280-00040>
- Fuxe, K., Kurosawa, N., Cintra, A., Hallström, Å., Gojny, M., Rosén, L., Agnati, L. F., Ungerstedt, U. (1992). Involvement of local ischemia in endothelin-1 induced lesions of the neostriatum of the anaesthetized rat. *Experimental Brain Research*, 88(1), 131–139. <http://doi.org/10.1007/BF02259134>
- Gerriets, T., Li, F., Silva, M. D., Meng, X., Brevard, M., Sotak, C. H., & Fisher, M. (2003). The macrosphere model: Evaluation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 122(2), 201–211. [http://doi.org/10.1016/S0165-0270\(02\)00322-9](http://doi.org/10.1016/S0165-0270(02)00322-9)
- Golomb, M. R., MacGregor, D. L., Domi, T., Armstrong, D. C., McCrindle, B. W., Mayank, S., & Deveber, G. A. (2001). Presumed pre- or perinatal arterial ischemic stroke: Risk factors and outcomes. *Annals of Neurology*, 50(2), 163–168. <http://doi.org/10.1002/ana.1078>
- * Granger, D. N., & Kvietys, P. R. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biology*, 6, 524–551. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.020>
- Gross, C. E., Bednar, M. M., Howard, D. B., & Sporn, M. B. (1993). Transforming growth factor-beta 1 reduces infarct size after experimental cerebral ischemia in a rabbit model. *Stroke*, 24(4), 558–562. <http://doi.org/10.1161/01.STR.24.4.558>
- Guarnieri, C., Flamigni, F., & Caldarera, C. M. (1980). Role of Oxygen in the Cellular Damage Induced by Re-oxygenation of Hypoxic Heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 12, 797–808.
- Gursoy-Ozdemir Y, Bolay H, Saribas O, D. T. (2000). Role of endothelial nitric oxide generation and peroxynitrite formation in reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 31, 1974–1980. <http://doi.org/10.1161/01.STR.31.8.1974>
- Hearse, D. J., Humphrey, S. M., & Chain, E. B. (1973). Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: A study of myocardial enzyme release. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 5(4), 395–407. [http://doi.org/10.1016/0022-2828\(73\)90030-8](http://doi.org/10.1016/0022-2828(73)90030-8)
- * Heinrich, P. C., Castell, J. V., & Andus, T. (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochemical Journal*, 265(3), 621–636.
- Heiss, W. D., & Rosner, G. (1983). Functional recovery of cortical neurons as related to degree and duration of ischemia. *Annals of Neurology*, 14(3), 294–301. <http://doi.org/10.1002/ana.410140307>
- Herrmann, M., Stern, M., Vollenweider, F., & Nitsch, C. (2004). Effect of inherent epileptic seizures on brain injury after transient cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Experimental Brain Research*, 154(2), 176–182. <http://doi.org/10.1007/s00221-003-1655-6>
- * Howells, D. W., Porritt, M. J., Rewell, S. S. J., O'Collins, V., Sena, E. S., van der Worp, H. B., Traystman, R. J., Macleod, M. R. (2010). Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 30(8), 1412–1431. <http://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.66>

- Hu, X., Wester, P., Brännström, T., Watson, B. D., & Gu, W. (2001). Progressive and reproducible focal cortical ischemia with or without late spontaneous reperfusion generated by a ring-shaped, laser-driven photothrombotic lesion in rats. *Brain Research Protocols*, 7(1), 76–85. [http://doi.org/10.1016/S1385-299X\(01\)00046-0](http://doi.org/10.1016/S1385-299X(01)00046-0)
- Huang, Z., Huang, P. L., Ma, J., Meng, W., Ayata, C., Fishman, M. C., & Moskowitz, M. A. (1996). Enlarged Infarcts in Endothelial Nitric Oxide Synthase Knockout Mice Are Attenuated by Nitro-L-Arginine. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 16, 981–987.
- Chen, Q., Chopp, M., Bodzin, G., & Chen, H. (1993). Temperature modulation of cerebral depolarization during focal cerebral ischemia in rats: correlation with ischemic injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 13(3), 389–94. <http://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.52>
- Chen, S. T., Hsu, C. Y., Hogan, E. L., Maricq, H., & Balentine, J. . (1986). A Model of Focal Ischemic Stroke in the Rat: Reproducible Extensive Cortical Infarction. *Stroke*, 17(4), 738–743.
- Chen, Y., Zhu, W., Zhang, W., Libal, N., Murphy, S. J., Offner, H., & Alkayed, N. J. (2015). A novel mouse model of thromboembolic stroke. *Journal of Neuroscience Methods*, 256, 203–211. <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.09.013>
- Chesselet, M.-F., Gonzales, C., Lin, C.-S., Polsky, K., & Jin, B.-K. (1990). Ischemic damage in the striatum of adult gerbils: Relative sparing of somatostatinergic and cholinergic interneurons contrasts with loss of efferent neurons. *Experimental Neurology*, 110(2), 209–218. [http://doi.org/10.1016/0014-4886\(90\)90032-N](http://doi.org/10.1016/0014-4886(90)90032-N)
- Iadecola, C., Zhang, F., Casey, R., Nagayama, M., & Ross, M. E. (1997). Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *The Journal of Neuroscience*, 17(23), 9157–9164.
- Ikeda, S., Harada, K., Ohwatashi, A., Kamikawa, Y., Yoshida, A., & Kawahira, K. (2013). A New Non-Human Primate Model of Photochemically Induced Cerebral Infarction. *PLoS ONE*, 8(3), e60037. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0060037>
- Kameyama, M., Suzuki, J., Shirane, R., & Ogawa, A. (1985). A new model of bilateral hemispheric ischemia in the rat – three vessel occlusion model. *Stroke*, 16(3), 489–493. <http://doi.org/10.1161/01.STR.16.3.489>
- * Kaste, M. (2005). Use of animal models has not contributed to development of acute stroke therapies: Pro. *Stroke*, 36, 2323–2324. <http://doi.org/10.1161/01.STR.0000179037.82647.48>
- Kaufmann, A. M., Firlik, A. D., Fukui, M. B., Wechsler, L. R., Jungries, C. A., & Yonas, H. (1999). Ischemic Core and Penumbra in Human Stroke. *Stroke*, 30(1), 93–99. <http://doi.org/10.1161/01.STR.30.1.93>
- Kleinschnitz, C., Braeuninger, S., Pham, M., Austinat, M., Nolte, I., Renne, T., Nieswandt, B., Bendszus, M., & Stoll, G. (2008). Blocking of Platelets or Intrinsic Coagulation Pathway-Driven Thrombosis Does Not Prevent Cerebral Infarctions Induced by Photothrombosis. *Stroke*, 39(4), 1262–1268. <http://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.496448>
- Kleinschnitz, C., Grund, H., Wingler, K., Armitage, M. E., Jones, E., Mittal, M., Barit, D., Schwarz, T., Geis, C., Kraft, P., Barthel, K., Schuhmann, M. K., Herrmann, A., M., Meuth, S. G., Stoll, G., Meurer, S., Schrewe, A., Becker, L., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Klopstock, T., Hrabe de Angelis, M., Jandeleit-Dahm, K., Shah, A. M., Weissmann, N., Harald H. H. W Schmidt, H. H. H. W. (2010). Post-stroke inhibition of induced NADPH Oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biology*, 8(9), e1000479. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000479>

- Kofler, J., Hattori, K., Sawada, M., DeVries, A. C., Martin, L. J., Hurn, P. D., & Traystman, R. J. (2004). Histopathological and behavioral characterization of a novel model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice. *J Neurosci Methods*, 136(1), 33–44. <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2003.12.024>
- Krishtal, O. A., & Pidoplichko, V. I. (1980). A receptor for protons in the nerve cell membrane. *Neuroscience*, 5(12), 2325–2327. [http://doi.org/10.1016/0306-4522\(80\)90149-9](http://doi.org/10.1016/0306-4522(80)90149-9)
- Kurth, T., Kase, C. S., Berger, K., Schaeffner, E. S., Buring, J. E., & Gaziano, J. M. (2003). Smoking and the risk of hemorrhagic stroke in men. *Stroke*, 34, 1151–1155. <http://doi.org/10.1161/01.STR.0000065200.93070.32>
- Lauer, K. K., Shen, H., Stein, E. A., Ho, K., Kampine, J. P., & Hudetz, A. G. (2002). Focal cerebral ischemia in rats produced by intracarotid embolization with viscous silicone. *Neurological Research*, 24, 181–90. <http://doi.org/10.1179/016164102101199594>
- Lee, J.-K., Park, M.-S., Kim, Y.-S., Moon, K.-S., Joo, S.-P., Kim, T.-S., Kim, J.-H., Kim, S.-H. (2007). Photochemically induced cerebral ischemia in a mouse model. *Surgical Neurology*, 67(6), 620–625. <http://doi.org/10.1016/j.surneu.2006.08.077>
- Levine, S. (1960). Anoxic-Ischemic Encephalopathy in Rats. *The American Journal of Pathology*, 36(1), 1–17. <http://doi.org/10.1017/S0022215100074594>
- Levine, S., & Payan, H. (1966). Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Experimental Neurology*, 16(3), 255–262. [http://doi.org/10.1016/0014-4886\(66\)90062-8](http://doi.org/10.1016/0014-4886(66)90062-8)
- Li, F., Omae, T., Fisher, M., Dietrich, W. D., & Kuluz, J. W. (1999). Spontaneous Hyperthermia and its Mechanism in the Intraluminal Suture Middle Cerebral Artery Occlusion Model of Rats Editorial Comment. *Stroke*, 30(11), 2464–2471. <http://doi.org/10.1161/01.STR.30.11.2464>
- * Lloyd-Jones, D., Adams, R., Carnethon, M., De Simone, G., Ferguson, T. B., Flegal, K., Ford, E., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S., Ho, M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., Lisabeth, L., Marelli, A., McDermott, M., Meigs, J., Mozaffarian, D., Nichol, G., O'Donnell, C., Roger, V., Rosamond, W., Sacco, R., Sorlie, P., Stafford, R., Steinberger, J., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Wong, N., Wylie-Rosett, J., & Hong, Y. (2009). Heart disease and stroke statistics 2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 119(3), 410–528. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.191261>
- Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S., & Cummins, R. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 20, 84–91. <http://doi.org/10.1161/01.STR.20.1.84>
- Lu, H., Li, Y., Yuan, L., Li, H., Lu, X., & Tong, S. (2014). Induction and imaging of photothrombotic stroke in conscious and freely moving rats. *Journal of Biomedical Optics*, 19(9), 096013. <http://doi.org/10.1117/1.JBO.19.9.096013>
- Macrae, I. M., Robinson, M. J., Graham, D. I., Reid, J. L., & McCulloch, J. (1993). Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 13(2), 276–284. <http://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.34>
- Mathers, C. D., & Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*, 3(11), e442. <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442>

- McBean, D. E., Winters, V., Wilson, a D., Oswald, C. B., Alps, B. J., & Armstrong, J. M. (1995). Neuroprotective efficacy of lifarizine (RS-87476) in a simplified rat survival model of 2 vessel occlusion. *British Journal of Pharmacology*, 116(8), 3093–3098. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb15110.x>
- Miyake, K., Takeo, S., & Kaijihar, H. (1993). Sustained decrease in brain regional blood flow after microsphere embolism in rats. *Stroke*, 24(3), 415–420. <http://doi.org/10.1161/01.STR.24.3.415>
- Nakagomi, S., Kiryu-Seo, S., & Kiyama, H. (2000). Endothelin-converting enzymes and endothelin receptor B messenger RNAs are expressed in different neural cell species and these messenger RNAs are coordinately induced in neurons and astrocytes respectively following nerve injury. *Neuroscience*, 101(2), 441–449. [http://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00345-6](http://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00345-6)
- O'Donnell, M. J., Denis, X., Liu, L., Zhang, H., Chin, S. L., Rao-Melacini, P., Rangarajan, S., Islam, S., Pais, P., McQueen, M. J., Mondo, C., Damasceno, A., Lopez-Jaramillo, P., Hankey, G. J., Dans, A. L., Yusuf, K., Truelsen, T., Diener, H. C., Sacco, R. L., Ryglewicz, D., Czlonkowska, A., Weimar, C., Wang, X., & Yusuf, S. (2010). Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): A case-control study. *The Lancet*, 376, 112–123. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60834-3](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60834-3)
- Olney, J. W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164(880), 719–721. <http://doi.org/10.1126/science.164.3880.719>
- Olsen, T. S., Skriver, E. B., & Herning, M. (1985). Cause of cerebral infarction in the carotid territory. Its relation to the size and the location of the infarct and to the underlying vascular lesion. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 16(3), 459–66. <http://doi.org/10.1161/01.STR.16.3.459>
- Overgaard, K., Sereghy, T., Boysen, G., Pedersen, H., Høyer, S., & Diemer, N. H. (1992). A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 12(3), 484–90. <http://doi.org/10.1038/jcbfm.1992.66>
- Paschen, W., Djuricic, B. M., Bosma, H.-J., & Hossmann, K.-A. (1983). Biochemical changes during graded brain ischemia in gerbils: Part 2. Regional evaluation of cerebral blood flow and brain metabolites. *Journal of the Neurological Sciences*, 58(1), 37–44. [http://doi.org/10.1016/0022-510X\(83\)90108-9](http://doi.org/10.1016/0022-510X(83)90108-9)
- Patt, A., Harken, A. H., Burton, L. K., Rodell, T. C., Piermattei, D., Schorr, W. J., Parker, N. B., Berger, E. M., Horesh, I. R., Terada, L. S., Linas, S. L., Cheronis, J. C., & Repine, J. E. (1988). Xanthine oxidase-derived hydrogen peroxide contributes to ischemia reperfusion-induced edema in gerbil brains. *Journal of Clinical Investigation*, 81(5), 1556–1562. <http://doi.org/10.1172/JCI113488>
- * Pekny, M., Wilhelmsson, U., & Pekna, M. (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neuroscience Letters*, 565, 30–38. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.071>
- Pontén, U., Ratcheson, R. A., Salford, L. G., & Siesjö, B. K. (1973). Optimal Freezing Conditions for Cerebral Metabolites in Rats. *Journal of Neurochemistry*, 21, 1127–1138. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1973.tb07567.x>
- Pulsinelli, W. A., & Brierley, J. B. (1979). A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 10(3), 267–272. <http://doi.org/10.1161/01.STR.10.3.267>
- Pulsinelli, W. A., & Buchan, A. M. (1988). The Four-Vessel Occlusion Rat Model: Method for Complete Occlusion of Vertebral Arteries and Control of Collateral Circulation. *Stroke*, 19(7), 913–914. <http://doi.org/10.1161/01.STR.19.7.913>

- Pulsinelli, W. A., Levy, D. E., & Duffy, T. E. (1983). Cerebral blood flow in the four-vessel occlusion rat model. *Stroke*, 14(5), 832–834. <http://doi.org/10.1161/01.STR.15.3.579.a>
- Purdy, P. D., Devous, M. D., Batjer, H. H., White, C. L., Meyer, Y., & Samson, D. S. (1989). Microfibrillar collagen model of canine cerebral infarction. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 20(10), 1361–1367. <http://doi.org/10.1161/01.STR.20.10.1361>
- Rice, J. E., Vannucci, R. C., & Brierley, J. B. (1981). The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of Neurology*, 9(2), 131–141. <http://doi.org/10.1002/ana.410090206>
- * Roberts, A. B., & Sporn, M. B. (1988). Transforming Growth Factor- β . In *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (pp. 275–308). Boston, MA: Springer US. http://doi.org/10.1007/978-1-4899-0185-9_8
- * Sacco, R. L., Kasner, S. E., Broderick, J. P., Caplan, L. R., Connors, J. J., Culebras, A., Elkind, M. S. V., George, M. G., Hamdan, A. D., Higashida, R. T., Hoh, B. L., Janis, L. S., Kase, C. S., Kleindorfer, D. O., Lee, J.-M., Moseley, M. E., Peterson, E. D., Turan, T. N., Valderrama, A. L., Vinters, H. V. (2013). An updated definition of stroke for the 21st century: A statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association. *Stroke*, 44, 2064–2089. <http://doi.org/10.1161/STR.0b013e318296aeca>
- Sharkey, J., Ritchie, I. M., & Kelly, P. A. (1993). Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 13(5), 865–871. <http://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.108>
- * Shi, S., Morike, K., & Klotz, U. (2008). The clinical implications of ageing for rational drug therapy. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 64, 183–199. <http://doi.org/10.1007/s00228-007-0422-1>
- Shiino, A., Harada, K., & Handa, J. (1989). Focal Brain Ischemia Model in Rats. An experimental study. *Surgical Neurology*, 31, 203–208. [http://doi.org/10.1016/0090-3019\(89\)90118-3](http://doi.org/10.1016/0090-3019(89)90118-3)
- Schilling, M., Besselmann, M., Leonhard, C., Mueller, M., Ringelstein, E. B., & Kiefer, R. (2003). Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: A study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Experimental Neurology*, 183(1), 25–33. [http://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00082-7](http://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00082-7)
- Schneider, G., Fries, P., Wagner-Jochem, D., Thome, D., Laurer, H., Kramann, B., Mautes, A., Hagen, T. (2002). Pathophysiological changes after traumatic brain injury: comparison of two experimental animal models by means of MRI. *Magma: Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology, and Medicine*, 14(3), 233–241. <http://doi.org/10.1007/BF02668217>
- Siemkowicz, E., & Hansen, a J. (1978). Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo-, normo- and hyperglycemic rats. *Acta Neurologica Scandinavica*, 58(1), 1–8. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1978.tb02855.x>
- * Simon, R. P. (2006). Acidotoxicity Trumps Excitotoxicity in Ischemic Brain. *Arch Neurol*, 63(10), 1368–1371. <http://doi.org/10.1001/archneur.63.10.1368>
- Simon, R. P., Swan, J. H., Griffiths, T., & Meldrum, B. S. (1984). Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science (New York, N.Y.)*, 226(4676), 850–2. <http://doi.org/10.1126/science.6093256>
- Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosen I, Wieloch T, S. B. (1984). Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A vessel occlusion model. *Acta Physiol Scand.*, 69, 385–401. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1984.tb07822.x>

- * Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 32(12), 638–647. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>
- * Sriram, K., & O’Callaghan, J. P. (2007). Divergent Roles for Tumor Necrosis Factor- α in the Brain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2(2), 140–153. <http://doi.org/10.1007/s11481-007-9070-6>
- Strong, K., Mathers, C., & Bonita, R. (2007). Series Preventing stroke : saving lives around the world. *World*, 6(February), 182–187. [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70031-5](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70031-5)
- Susin, S. a, Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., & Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718), 441–446. <http://doi.org/10.1038/17135>
- Suzuki, R., Yamaguchi, T., Kirino, T., Orzi, F., & Klatzo, I. (1983). The effects of 5-minute ischemia in mongolian gerbils: I. Blood-brain barrier, cerebral blood flow, and local cerebral glucose utilization changes. *Acta Neuropathologica*, 60(3-4), 207–216. <http://doi.org/10.1007/BF00691868>
- Tamura, A., Graham, D. I., McCulloch, J., & Teasdale, G. M. (1981). Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1(1), 53–60. <http://doi.org/10.1038/jcbfm.1981.6>
- Thal, S. C., Thal, S. E., & Plesnila, N. (2010). Characterization of a 3-vessel occlusion model for the induction of complete global cerebral ischemia in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 192(2), 219–227. <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.07.032>
- The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. (1995). Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med*, 333(24), 1581–1587. <http://doi.org/10.1056/NEJM199512143332401>
- Türeyen, K., Vemuganti, R., Sailor, K. A., & Dempsey, R. J. (2005). Ideal suture diameter is critical for consistent middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurosurgery*, 56(1 SUPPL.), 196–200. <http://doi.org/10.1227/01.NEU.0000144490.92966.59>
- Uesugi, M., Kasuya, Y., Hayashi, K., & Goto, K. (1998). SB209670, a potent endothelin receptor antagonist, prevents or delays axonal degeneration after spinal cord injury. *Brain Research*, 786, 235–239. [http://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01431-5](http://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01431-5)
- * Vannucci, R. C., Connor, J. R., Mauger, D. T., Palmer, C., Smith, M. B., Towfighi, J., & Vannucci, S. J. (1999). Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res*, 55(2), 158–163. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990115\)55:2<158::AID-JNR3>3.3.CO;2-T](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990115)55:2<158::AID-JNR3>3.3.CO;2-T)
- von Planta, I., Weil, M. H., von Planta, M., Bisera, J., Bruno, S., Gazmuri, R. J., & Rackow, E. C. (1988). Cardiopulmonary resuscitation in the rat. *Journal of Applied Physiology*, 65(6), 2641–2647.
- Watson, B. D., Dietrich, W. D., Busto, R., Wachtel, M. S., & Ginsberg, M. D. (1985). Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Annals of Neurology*, 17, 497–504. <http://doi.org/10.1002/ana.410170513>
- Windle, V., Szymanska, A., Granter-Button, S., White, C., Buist, R., Peeling, J., & Corbett, D. (2006). An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-1 in the rat. *Experimental Neurology*, 201(2), 324–334. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.04.012>

- Xu, B., Xiao, A.-J., Chen, W., Turlova, E., Liu, R., Barszczyk, A., Sun, C. L. F., Liu, L., Tymianski, M., Feng, Z.-P., Sun, H.-S. (2015). Neuroprotective Effects of a PSD-95 Inhibitor in Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Molecular Neurobiology*, 1–9. <http://doi.org/10.1007/s12035-015-9488-4>
- Yamori, Y., Horie, R., Handa, H., Sato, M., & Fukase, M. (1976). Pathogenetic Similarity of Strokes in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats and Humans. *Stroke*, 7(1), 46–53. <http://doi.org/10.1161/01.STR.7.1.46>
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Goto, K., & Masaki, T. (1988). A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca^{2+} channels. *Journal of Hypertension*, 6(4), 188–191.
- Yang, Y., Yang, T., Li, Q., Wang, C. X., & Shuaib, A. (2002). A new reproducible focal cerebral ischemia model by introduction of polyvinylsiloxane into the middle cerebral artery: A comparison study. *Journal of Neuroscience Methods*, 118(2), 199–206. [http://doi.org/10.1016/S0165-0270\(02\)00142-5](http://doi.org/10.1016/S0165-0270(02)00142-5)
- Yrjänheikki, J., Tikka, T., Keinänen, R., Goldsteins, G., Chan, P. H., & Koistinaho, J. (1999). A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(23), 13496–13500. <http://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13496>
- Zhang, L., Zheng, G. Z., Zhang, C., Rui, L. Z., & Chopp, M. (2004). Intravenous administration of a GPIIb/IIIa receptor antagonist extends the therapeutic window of intra-arterial tenecteplase-tissue plasminogen activator in a rat stroke model. *Stroke*, 35(12), 2890–2895. <http://doi.org/10.1161/01.STR.0000147963.68238.da>
- Zhang, R. L., Chopp, M., Zhang, Z. G., Jiang, Q., & Ewing, J. R. (1997). A rat model of focal embolic cerebral ischemia. *Brain Research*, 766(1-2), 83–92. <http://doi.org/10.1097/00004647-199710000-00010>
- Zhang, Z., Chopp, M., & Powers, C. (1997). Temporal profile of microglial response following transient (2 h) middle cerebral artery occlusion. *Brain Research*, 744(2), 189–198. [http://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01085-2](http://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01085-2)